

Untersuchungen zur möglichen Wirksamkeit von
small interfering RNA auf die Vermehrung des
felines Leukämievirus *in vitro*

von Melanie Lehmann, geborene Frank

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchungen zur möglichen Wirksamkeit von
small interfering RNA auf die Vermehrung des
felines Leukämievirus *in vitro*

von Melanie Lehmann, geborene Frank

aus Bochum

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Medizinische Kleintierklinik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatte: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Die Unvollkommenheit des Menschen ist immer
ein Misston in der Harmonie unserer Ideale.

CG Jung

In Liebe HE

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Wirksamkeit antiviraler Hemmstoffe auf die Vermehrung des feline	
	Leukämievirus <i>in vitro</i>	2
1.1.	Hemmstoffe der Reversen Transkriptase	3
1.1.1.	Nukleosidische Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus	3
1.1.1.1.	Zidovudin	4
1.1.1.2.	Zalcitabin.....	5
1.1.1.3.	Didanosin	6
1.1.1.4.	Gemcitabin	6
1.1.1.5.	Decitabin	7
1.1.2.	Nukleotidische Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus.....	12
1.1.2.1.	Adefovir	12
1.1.2.2.	Tenofovir.....	12
1.1.3.	Nicht-nukleosidische Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus	15
1.2.	Integrase-Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus	18
1.3.	Eintrittshemmstoffe und deren Wirkmechanismus	20
1.3.1.	Fusionshemmstoffe	20
1.3.2.	Sulfatierte Polysaccharide	21
2.	Wirksamkeit von RNA-Interferenz auf die Vermehrung feline Viren	
	<i>in vitro</i>	24
2.1.	Moleküle der RNA-Interferenz	24
2.1.1.	Small interfering RNA und deren Wirkmechanismus	24
2.1.2.	Short hairpin RNA und deren Wirkmechanismus.....	27
2.2.	Hemmung feline Viren durch RNA-Interferenz <i>in vitro</i>	29
2.2.1.	Hemmung der Vermehrung des feline Immunschwächevirus	29
2.2.2.	Hemmung der Vermehrung des feline Coronavirus	33
2.2.3.	Hemmung der Vermehrung des feline Herpesvirus.....	33
2.2.4.	Hemmung der Vermehrung des feline Leukämievirus	34
III.	PUBLIKATION	38
IV.	DISKUSSION	48

V.	ZUSAMMENFASSUNG	63
VI.	SUMMARY.....	65
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
VIII.	DANKSAGUNG	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AU	Adenin-Uracil
AZT	Azidothymidin, Zidovudin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ca.	circa
CCR5	Chemokin-Korezeptor 5 (CC-Motiv)
CXCR4	Chemokin-Korezeptor 4 (CXC-Motiv)
CD4 ⁺ -Rezeptor	CD4 ⁺ -Rezeptor-exprimierende Zellen
CrFK	Crandell-Rees feline kidney (Crandell-Rees feline Nierenzellen)
ddC	Didesoxycytidin, Zalcitabin
ddI	Didesoxyinosin, Didanosin
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DS	Dextransulfat
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid (doppelsträngige Ribonukleinsäure)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur)
enFeLV	endogenous feline leukemia virus (endogenes felines Leukämievirus)
<i>env</i>	envelope (Hülle)
env-siRNA	envelope small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Hülle)
envL-siRNA	long envelope small interfering ribonucleic acid (kurze

	interferierende Ribonukleinsäure Hülle, lang)
envS-siRNA	short envelope small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Hülle, kurz)
env/rez-siRNA	envelope/receptor small interfering ribonucleic acid (kurze kombinierte interferierende Ribonukleinsäure Hülle/Rezeptor)
env/rezL-siRNA	long envelope/receptor small interfering ribonucleic acid (kurze kombinierte interferierende Ribonukleinsäure Hülle/Rezeptor, lang)
env/rezS-siRNA	short envelope/receptor small interfering ribonucleic acid (kurze kombinierte interferierende Ribonukleinsäure Hülle/Rezeptor, kurz)
et al.	et alii (und andere)
FCoV	feline coronavirus (felines Coronavirus)
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten)
FEA	feline embryonic fibroblasts (feline embryonale Fibroblasten)
FeLV	feline leukemia virus (felines Leukämievirus)
feTHTR1	felines Thiamin-Transport-Protein-1
FHV-1	feline herpes virus-1 (felines Herpesvirus-1)
FIV	feline immunodeficiency virus (felines Immunschwächevirus)
FFU	focus forming units (Fokus-bildende Einheiten)
<i>gag</i>	gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
GU	Guanin-Uracil

HAART	highly active anti-retroviral therapy (hochaktive antiretrovirale Therapie)
HBV	hepatitis B virus (Hepatitis-B-Virus)
HCV	hepatitis C virus (Hepatitis-C-Virus)
HEK	human embryonic kidney (menschliche embryonale Nierenzellen)
HIV	human immunodeficiency virus (humanes Immunschwächevirus)
HIV-1	human immunodeficiency virus-1 (humanes Immunschwächevirus-1)
IFN- β	Interferon-beta
INI	Integraseinhibitor
khv	koi herpes virus (Koi-Herpes-Virus)
khvL-siRNA	long koi herpes virus small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Koi-Herpes-Virus, lang)
khvS-siRNA	short koi herpes virus small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Koi-Herpes-Virus, kurz)
KT	Kawakami-Theilen
L	long (lang)
M	Boten-Ribonukleinsäure der Virusmembran
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
μM	Mikromol
Min.	Minuten
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MuLV	murine leukemia virus (Murines Leukämievirus)

NK	Boten-Ribonukleinsäure des Nukleokapsids
NNRTI	Nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverser-Transkriptase-Inhibitor
NtRTI	Nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
ON	Oligonukleotid
PMEA	9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)Adenin, Adefovir
<i>pol</i>	Polymerase
qRT-PCR	quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
rez	Rezeptor
rez-siRNA	receptor small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Rezeptor)
rezL-siRNA	long receptor small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Rezeptor, lang)
rezS-siRNA	short receptor small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure Rezeptor, kurz)
RISC	ribonucleic acid-reduced silencing complex
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	ribonucleic acid interference (Ribonukleinsäure-Interferenz)
(R)-PMPA	(R)-9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)Adenin, Tenofovir
RT	Reverse Transkriptase
RTI	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
S	short (kurz)
shRNA	short hairpin ribonucleic acid (kurze Haarnadel-strukturartige Ribonukleinsäure)

siRNA	small interfering ribonucleic acid (kurze interferierende Ribonukleinsäure)
SPF-K	spezifisch-Pathogen-freie Katzen
Std.	Stunden
T-20	Enfuvirtid
TCID ₅₀	tissue culture infection dose 50 (50 %ige infektiöse Dosis in der Zellkultur)
TDF	Tenofovirdisoproxil
TLR	Toll-like Rezeptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TM	Transmembranprotein
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
vAG	virales Antigen
vRNA	viral ribonucleic acid (virale Ribonukleinsäure)
YMDD	Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat
YVDD	Tyrosin-Valin-Aspartat-Aspartat
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Das feline Leukämievirus (FeLV) wurde 1964 erstmals entdeckt (JARRETT et al., 1964). FeLV ist ein Gammaretrovirus (HOOVER & MULLINS, 1991). Durch die eigene Reverse Transkriptase (RT) kann es seine einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) in eine Desoxyribonukleinsäure (DNA) umschreiben (PEDERSEN, 1990) und diese in das Wirtszellgenom integrieren (JARRETT, 1999). Es gibt bis heute keine nachweislich wirksame Therapie gegen die FeLV-Infektion. Viele antivirale Medikamente haben Nebenwirkungen und sind daher nur eingeschränkt einsetzbar (HASCHEK et al., 1990; HOOVER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990; HARTMANN et al., 1992). Ein neuer Therapieansatz ist eine spezifisch synthetisierte, einem viralen Genabschnitt komplementäre, 21 bis 23 Nukleotid-lange RNA (small interfering RNA, siRNA) (HAMMOND et al., 2000; ZAMORE et al., 2000; KETTING, 2011). SiRNAs hemmen die Virusvermehrung post-transkriptional, indem sie komplementär an die virale Zielsequenz binden (BAULCOMBE, 1999; ELBASHIR et al., 2001a; SONTHEIMER, 2005).

Die antivirale Wirksamkeit von siRNAs wurde bisher *in vitro* gegen Infektionen mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV) des Menschen (CAPODICI et al., 2002), gegen Infektionen mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) (BABA et al., 2007; BABA et al., 2008), feline Coronavirus (FCoV) (MCDONAGH et al., 2011) und feline Herpesvirus-1 (FHV-1) der Katzen (WILKES & KANIA, 2009), gegen Infektionen mit dem caninen Parvovirus der Hunde (HE et al., 2012) und gegen Infektionen mit dem murinen Leukämievirus (MuLV) der Mäuse (YE & JIN, 2006) untersucht. Ziel der vorliegenden Studie war es, die antivirale Wirksamkeit spezifisch synthetisierter siRNAs gegen eine FeLV-Replikation *in vitro* zu untersuchen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Wirksamkeit antiviraler Hemmstoffe auf die Vermehrung des feline Leukämievirus *in vitro*

Eine FeLV-Infektion kann bei Katzen Immunsuppression, Knochenmarksuppression und Tumore hervorrufen (HARDY et al., 1976). In vielen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien wurde die Wirksamkeit antiviraler Chemotherapeutika gegen FeLV untersucht (TAVARES et al., 1987; TAVARES et al., 1989; ZEIDNER et al., 1989; HOOVER et al., 1990; POLAS et al., 1990; SWENSON et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990; HOOVER et al., 1991; SWENSON et al., 1991; HARTMANN et al., 1992; BOENZLI et al., 2011; CATTORI et al., 2011; GREGGS et al., 2012).

Obwohl HIV ein Lentivirus und FeLV ein Gammaretrovirus ist, wurden aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit viele der gegen HIV wirksamen Medikamente auch gegen FeLV erforscht (GREGGS et al., 2012). Antiretrovirale Chemotherapeutika können in verschiedene Abschnitte des viralen Vermehrungszyklus eingreifen und eine Virusvermehrung hemmen. Sie werden je nach Angriffsziel innerhalb des viralen Zyklus in Hemmstoffe der RT, der Protease, der Integrase und in Eintrittshemmstoffe eingeteilt (DE CLERCQ, 2009; ARTS & HAZUDA, 2012; DE CLERCQ, 2013). Abbildung 1 veranschaulicht die einzelnen Schritte eines retroviralen Vermehrungszyklus am Beispiel von HIV.

Bis heute gibt es nachweislich keine wirksame Therapie für die Behandlung FeLV-infizierter Katzen. Die eingesetzten antiviralen Wirkstoffe sind entweder *in vivo* nicht ausreichend wirksam oder zu toxisch (POLAS et al., 1990; SWENSON et al., 1990; HARTMANN et al., 1992; GREGGS et al., 2012).

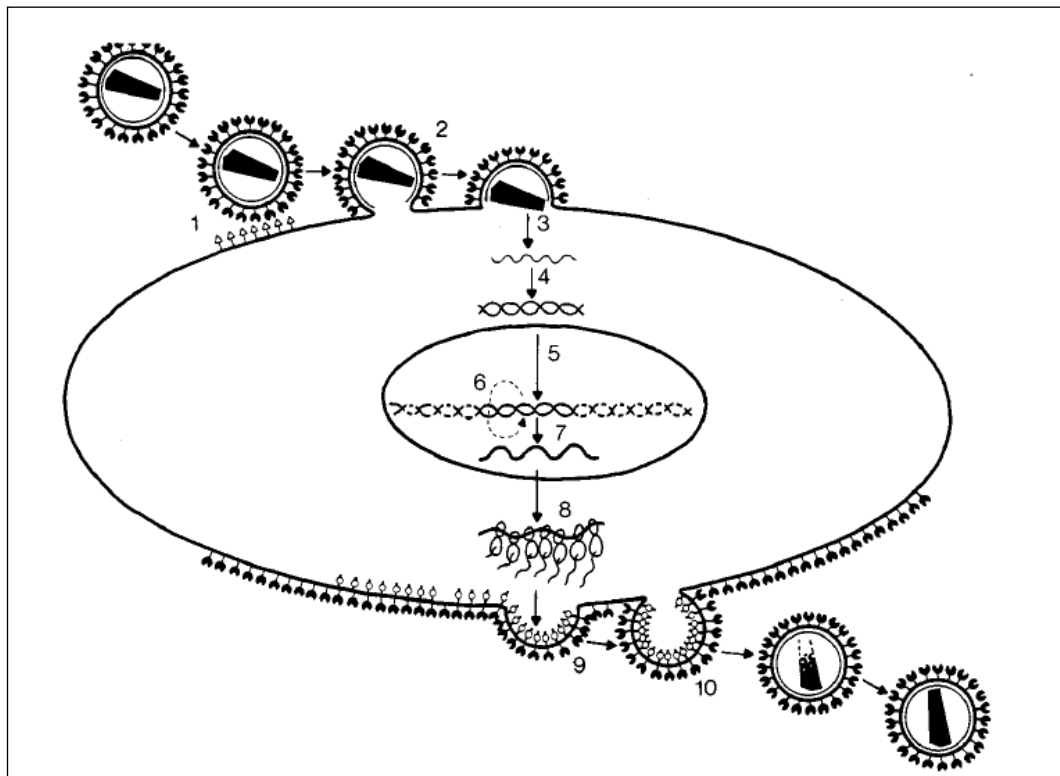


Abbildung 1 (DE CLERCQ, 1995): Schematische Darstellung des retroviralen Vermehrungszyklus am Beispiel von HIV. Bindung des Virus an die Wirtszelloberfläche (1), Viruseintritt in die Wirtszelle (2), Freisetzung des Nukleokapsids (virales Genom, RT, Protease, Integrase; 3), virale reverse Transkription (4), Integration der proviralen DNA in das Wirtszellgenom (5), Replikation (6), Transkription (7), Translation (8), Reifung (9), Knospung und Freisetzung gebildeter Viruspartikel (10).

1.1. Hemmstoffe der Reversen Transkriptase

Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RTI) sind Medikamente, die die virale RT und dadurch die Virusvermehrung hemmen. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die virale RNA in eine DNA umschreibt. Die virale DNA kann dann in das Wirtszellgenom integriert werden. Zu den RTI zählen nukleosidische RTI (NRTI), nukleotidische RTI (NtRTI) und nicht-nukleosidische RTI (NNRTI) (DE CLERCQ, 2009).

1.1.1. Nukleosidische Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus

NRTI sind 2', 3'-Didesoxynukleosid-Analoga (DE CLERCQ, 2009). Sie zählen zu den ersten antiviralen Chemotherapeutika, die von der Federal Drug and Food

Administration (FDA) zur Behandlung von HIV zugelassen wurden (YOUNG, 1988).

NRTI unterscheiden sich durch eine fehlende 3'-Hydroxygruppe von den natürlich vorkommenden Nukleosiden. NRTI werden in der Zelle dreifach phosphoryliert und dadurch aktiviert. Danach werden sie während der reversen Transkription von der RT als falscher Baustein in den DNA-Strang eingebaut. Durch die fehlende Hydroxygruppe kommt es zum Kettenabbruch. Die Virusreplikation wird somit gestoppt (DE CLERCQ, 2009).

Die Wirksamkeit der einzelnen NRTI unterscheidet sich bei Lentiviren (HIV, FIV) und Oncoretroviren (MuLV, FeLV) (OPERARIO et al., 2005). Auch wenn FeLV und HIV eine große Ähnlichkeit besitzen, ist der Aufbau ihrer RT unterschiedlich. Bei HIV und FIV besteht das aktive Zentrum der RT aus einem Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat-(YMDD-)Motiv (POCH et al., 1989; BARBER et al., 1990). Bei FeLV ist das Methionin durch die Aminosäure Valin ersetzt (YVDD) (DONAHUE et al., 1988). Die Aminosäure (Methionin oder Valin) im aktiven Zentrum der RT der Retroviren, ist ausschlaggebend für die Aufnahmefähigkeit eines NRTI (POCH et al., 1989; BOYER et al., 2001; OPERARIO et al., 2005). So sind NRTI mit einem modifizierten Zucker (zum Beispiel (z. B.) Lamivudin) gegen HIV und FIV wirksam und bei MuLV und FeLV kaum (CHERRINGTON et al., 1996; REZENDE et al., 1998; BOYER et al., 2001; OPERARIO et al., 2005). Durch die Aminosäure Valin bei MuLV und FeLV wird der Einbau von NRTI mit modifizierten Zuckern räumlich behindert (BOYER et al., 2001; OPERARIO et al., 2005).

1.1.1.1. Zidovudin

Das Thymidinanalogon Zidovudin (3'-Azido-3'-Desoxythymidin, Azidothymidin, AZT) wurde 1964 erstmalig synthetisiert (HORWITZ et al., 1964; LIN & PRUSOFF, 1978). AZT wurde 1987 als erstes Medikament für die Behandlung HIV-infizierter Menschen zugelassen (DE CLERCQ, 2013). Auch die antivirale Wirksamkeit von AZT gegen FeLV wurde in verschiedenen Studien untersucht (TAVARES et al., 1987; TAVARES et al., 1989; HOOVER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1993, 1995). AZT gehört zu den am besten erforschten antiviralen Medikamenten in der Tiermedizin (HARTMANN, 2012).

AZT unterdrückt eine FeLV-Vermehrung *in vitro*. In den Studien wurde AZT 24 Stunden bis 45 Minuten vor einer FeLV-Infektion zu den Zellkulturen gegeben. In allen Studien wurde die FeLV-Vermehrung durch unterschiedliche AZT-Konzentrationen zu 40 % bis 100 % unterdrückt (TAVARES et al., 1987; TAVARES et al., 1989; HOOVER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990; MATHES et al., 1992; MUKHERJI et al., 1994) (Tabelle 1). Eine Zytotoxizität wurde bei einer AZT-Konzentration von 100 µg/ml in U937-Zellen beobachtet. In den U937-Zellen war die AZT-Aufnahmekapazität geringer. Dadurch akkumulierte sich AZT im Zellkulturüberstand, wodurch eine Zytotoxizität ausgelöst wurde. In anderen Zelllinien (MOLT4, HT1080) wurde keine Zytotoxizität gefunden (MUKHERJI et al., 1994).

AZT wird aufgrund seiner Nebenwirkungen *in vivo* nur selten zur Therapie der FeLV-Infektion angewendet. Es verursacht meistens eine aregenerative Anämie und Neutropenie bei Katzen (HASCHEK et al., 1990; HARTMANN et al., 1992). Bei persistent infizierten Katzen ist AZT kaum wirksam (TAVARES et al., 1987).

1.1.1.2. Zalcitabin

Das Cytosinanalagon Zalcitabin (2', 3'-Didesoxycytidin, ddC) wurde 1966 entwickelt (HORWITZ et al., 1966). In Studien wurde die antivirale Wirksamkeit von ddC gegen HIV nachgewiesen (MITSUYA & BRODER, 1986; DAHLBERG et al., 1987). 1992 wurde Zalcitabin von der FDA für die Behandlung von HIV-Patienten zugelassen, allerdings 2006 wieder vom Markt genommen, da andere noch besser wirksame NRTI verfügbar wurden (FDA, 2015d).

Zalcitabin hemmt *in vitro* die FeLV-Vermehrung. Es wurde 24 Stunden bis 45 Minuten vor oder gleichzeitig mit einer FeLV-Infektion zu den Zellen gegeben, um die wirksame Konzentration und das antivirale Hemmpotential von ddC nachzuweisen (TAVARES et al., 1989; ZEIDNER et al., 1989; POLAS et al., 1990) (Tabelle 2). In chronisch infizierten FL74-Zellen wurde bei einer ddC-Konzentration bis zu 64 µM kein antiviraler Hemmeffekt beobachtet (POLAS et al., 1990). 12 – 20 µg/ml ddC waren in einer Studie zytotoxisch (ZEIDNER et al., 1989). In einer anderen Studie wurde dagegen keine Zytotoxizität beobachtet (POLAS et al., 1990).

Zalcitabin ist in wirksamen Hemmstoffkonzentrationen bei Katzen sehr toxisch. Schon geringe Konzentrationen führen zu einer chronisch progressiven

Thrombozytopenie. Für Katzen verträgliche Konzentrationen haben kaum eine Wirksamkeit gegen FeLV (POLAS et al., 1990).

1.1.1.3. Didanosin

Didanosin (2', 3'-Didesoxyinosin, ddI) ist ein Inosinanalogon. Seine antivirale Wirksamkeit gegen HIV wurde 1986 erstmalig entdeckt (MITSUYA & BRODER, 1986). Seit 1991 ist ddI für die Behandlung von HIV-infizierten Menschen zugelassen (FDA, 2015a). Seit 2013 ist es auch für die Behandlung von HIV im Vereinigten Königreich und einigen Mitgliedstaaten der Europäischen Union zugelassen (EMA, 2015b).

Intrazellulär wird ddI in das aktive Didesoxyadenosin-Triphosphat umgewandelt (PERRY & BALFOUR, 1996). Es unterdrückt wie AZT und ddC eine FeLV-Vermehrung *in vitro*. Die Zellen wurden 24 Stunden bis 45 Minuten vor einer FeLV-Infektion mit ddI behandelt (TAVARES et al., 1989; MUKHERJI et al., 1994) (Tabelle 3). 100 µg/ml ddI waren in U937-Zellen zytotoxisch. Die 50%ige hemmende Konzentration war zehn bis 20 Mal niedriger als die zytotoxische Dosis und hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität (MUKHERJI et al., 1994).

1.1.1.4. Gemcitabin

Gemcitabin (2', 2'-Difluoro-2'-Desoxycytidin) ist ein Cytosinanalogon. Es ist seit 2006 für die Behandlung von Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und beim nicht-kleinzelligem Lungenkrebs des Menschen zugelassen (FDA, 2015b). Die Wirksamkeit von Gemcitabin gegen HIV wurde ebenfalls nachgewiesen (CLOUSER et al., 2010). Bislang wurde in einer Studie die Wirksamkeit von Gemcitabin gegen eine FeLV-Replikation *in vitro* untersucht. Dafür wurden CrFK-Zellen zwei Stunden vor FeLV-Infektion mit Gemcitabin behandelt. Die Anzahl der infizierten Zellen wurde nach zwei Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Tabelle 4). Eine Zytotoxizität wurde nur bei einer sehr hohen Konzentration (0,23 µM) beobachtet (GREGGS et al., 2012).

Gemcitabin hat einen modifizierten Zuckerrest. Durch die Aminosäure Valin im aktiven Zentrum der FeLV-RT, kann die Aufnahme eines NRTI mit einem modifizierten Zuckerrest blockiert werden (OPERARIO et al., 2005). Trotzdem wurde durch Gemcitabin die FeLV-Vermehrung effektiv gehemmt (GREGGS et al., 2012). Gemcitabin könnte nicht als Substrat der RT während der viralen Replikation in die DNA eingebaut worden sein, sondern die virale Vermehrung

durch eine Interaktion mit den dafür benötigten Desoxyribonukleosid-triphosphaten behindert haben. Diese werden normalerweise von der RT während der Elongationsphase der viralen Replikation für die Bildung eines komplementären viralen Stranges zum Matrizenstrang gebraucht (BEBENEK et al., 1992; GREGGS et al., 2012).

Gemcitabin wird bei Menschen intravenös appliziert. Die Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Gemcitabin ist gering. Dies liegt an der geringen intestinalen Permeabilität und dem schnellen enzymatischen Abbau über Cytidin-Desaminasen. Durch die rasche Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe in der Leber akkumuliert Gemcitabin. Dadurch kann kein ausreichender Wirkspiegel erreicht werden (CLOUSER et al., 2010). Als Prodrug wird die intestinale Permeabilität verbessert und die Phosphorylierung in der Leber und Akkumulation von Gemcitabin vermindert (MOYSAN et al., 2013). Durch die zusätzliche Gabe von Tetrahydrouridin (Cytidin-Desaminase-Inhibitor) kann die Desaminierung von Gemcitabin unterdrückt werden (CLOUSER et al., 2014).

1.1.1.5. Decitabin

Decitabin (5-Aza-2'-Desoxycytidin) zählt ebenfalls zu den Cytosinanaloga. In den Vereinigten Staaten ist es seit 2006 zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms in der Humanmedizin zugelassen (GARCIA et al., 2010; FDA, 2015c). Seit 2012 ist Decitabin in der Europäischen Union zur Behandlung der akuten myelodischen Leukämie des Menschen zugelassen (EMA, 2015a). Kürzlich wurde eine antivirale Wirksamkeit von Decitabin gegen HIV nachgewiesen (CLOUSER et al., 2014).

In einer *in-vitro*-Studie wurde auch die antivirale Wirksamkeit von Decitabin gegen FeLV untersucht. Dafür wurden CrFK-Zellen zwei Stunden vor einer FeLV-Infektion mit Decitabin behandelt. Nach zwei Tagen wurde die Anzahl infizierter Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Weiterhin wurde die 50%ige Hemmstoffkonzentration nachgewiesen (Tabelle 5). Konzentrationen von mehr als 158 µM waren zytotoxisch (GREGGS et al., 2012).

Auch Decitabin wird bei Menschen intravenös verabreicht. Als Prodrug wird es erst intrazellulär aktiviert. Wie Gemcitabin erreicht oral gegebenes Decitabin keinen ausreichenden Wirkspiegel, da es intestinal schlecht absorbiert und enzymatisch schnell abgebaut wird (CLOUSER et al., 2014).

Tabelle 1: Wirksamkeit von Zidovudin gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK, Crandell-Rees feline kidney; Min., Minuten; Std., Stunden; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; μM , Mikromol; *, Konzentration in Mikromol bei einem Molekulargewicht von 267,24 Gramm pro Mol; \pm , mittlere Standardabweichung)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (μM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
A/Rickard	81C	45 Min. vorher	focus induction assay	50 – 100	100	12	TAVARES et al., 1987; TAVARES et al., 1989
A/Rickard	81C	45 Min. vorher	focus induction assay	1	60	12	TAVARES et al., 1987; TAVARES et al., 1989
61C/E	CrFK	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,0019 – 0,019*	100	4	HOOVER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990
61C/E	CrFK	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,000037*	40	4	HOOVER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990
A/Rickard	3201	18 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,011	90	5	MATHES et al., 1992
A/Rickard	3201	18 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,0046	50	5	MATHES et al., 1992
C/Sarma	MOLT4	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,02 \pm 0,006	50	11	MUKHERJI et al., 1994
C/Sarma	HT1080	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	1,75 \pm 0,86	50	11	MUKHERJI et al., 1994
C/Sarma	U937	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	2,31 \pm 1,3	50	11	MUKHERJI et al., 1994

Tabelle 2: Wirksamkeit von Zalcitabin gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK, Crandell-Rees feline kidney; SPF-K (3/3), Knochenmarkszellen drei spezifisch-Pathogen-freier Katzen; Std., Stunden; Min., Minuten; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; #, infektiöser Zellkulturüberstand als Inokulum in 81C-Zellen; µM, Mikromol; *, Konzentration in Mikromol bei einem Molekulargewicht von 211,22 Gramm pro Mol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (µM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
61C/E	81C	24 Std. vorher	focus induction assay	0,047*	90	10	ZEIDNER et al., 1989
61C/E	81C	24 Std. vorher	focus induction assay	0,024*	70	10	ZEIDNER et al., 1989
61C/E	CrFK	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,047*	90	10	ZEIDNER et al., 1989
61C/E	CrFK	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,024*	70	10	ZEIDNER et al., 1989
A/Rickard	81C	45 Min. vorher	focus reduction assay	10	100	12	TAVARES et al., 1989
A/Rickard	81C	45 Min. vorher	focus reduction assay	5	90	12	TAVARES et al., 1989
A/Fea	3201	gleichzeitig	indirect focal infectivity assay [#]	10	90	5	POLAS et al., 1990
A/Fea	3201	gleichzeitig	indirect focal infectivity assay [#]	5	70	5	POLAS et al., 1990
A/Fea	81C	gleichzeitig	direct focal reduction assay	12,13	80	10	POLAS et al., 1990
A/Fea	81C	gleichzeitig	direct focal reduction assay	0,1	60	10	POLAS et al., 1990
A/Fea	SPF-K (3/3)	gleichzeitig	indirect focal infectivity assay [#]	43 – 128 (2/3)	80	7	POLAS et al., 1990

A/Fea	SPF-K (3/3)	gleichzeitig	indirect focal infectivity assay [#]	128 – 384 (1/3)	80	7	POLAS et al., 1990
-------	----------------	--------------	---	-----------------	----	---	--------------------

Tabelle 3: Wirksamkeit von Didanosin gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; Min., Minuten; Std., Stunden; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; μ M, Mikromol; \pm , mittlere Standardabweichung)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (μ M)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studien
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
A/Rickard	81C	45 Min. vorher	focus reduction assay	100	60	12	TAVARES et al., 1989
A/Rickard	81C	45 Min. vorher	focus reduction assay	50	50	12	TAVARES et al., 1989
C/Sarma	MOLT4	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	$4,31 \pm 1,29$	50	11	MUKHERJI et al., 1994
C/Sarma	HT1080	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	$9,52 \pm 3,93$	50	11	MUKHERJI et al., 1994
C/Sarma	U937	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	$43,5 \pm 40,9$	50	11	MUKHERJI et al., 1994

Tabelle 4: Wirksamkeit von Gemcitabin gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK, Crandell-Rees feline kidney; Std., Stunden; μM , Mikromol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- Konzentration (μM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
61E/C	CrFK	2 Std. vorher	Durchflusszytometrie	0,025	50	2	GREGGS et al., 2012

Tabelle 5: Wirksamkeit von Decitabin gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK-Zellen, Crandell-Rees feline kidney; Std., Stunden; μM , Mikromol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- Konzentration (μM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
61E/C	CrFK	2 Std. vorher	Durchflusszytometrie	0,44	50	2	GREGGS et al., 2012

1.1.2. Nukleotidische Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus

NtRTI sind Nukleotidanaloga. Daher müssen sie im Gegensatz zu den Nukleosidanaloga für eine Aktivierung intrazellulär nur zweifach phosphoryliert werden. NtRTI werden wie NRTI von der viralen RT in die DNA eingebaut, um die virale Replikation zu hemmen (DE CLERCQ, 2009). Adefovir und Tenofovir gehören zu den NtRTI und sind azyklische Nukleosidphosphonate. Durch ihre Phosphonatgruppe (direkte Kohlenstoff-Phosphat-Bindung) können sie nicht hydrolytisch gespalten werden (PERTUSATI et al., 2014). Daher sind azyklische Nukleosidphosphonate am terminalen 3'-Ende der DNA stabiler als NRTI (DE CLERCQ, 2009).

1.1.2.1. Adefovir

Adefovir ((9-(2-Phosphonomethoxypropyl)Adenin), PMEA) ist ein Adenosin-analogon und gehört zu den azyklischen Nukleosidphosphonaten (PERTUSATI et al., 2014). Es wurde 1989 erstmalig entdeckt (BRONSON et al., 1989). In der Humanmedizin wird Adefovir für die Behandlung von Hepatitis-B-Virus (HBV)-infizierten Menschen eingesetzt (DE CLERCQ, 2011).

Adefovir entsteht nach oraler Aufnahme aus dem Prodrug Adefovirdipivoxil (DE CLERCQ, 2011). Die antivirale Wirksamkeit von PMEA wurde gegen FeLV *in vitro* untersucht (Tabelle 6). Die Zellkulturen wurden 24 Stunden vor einer FeLV-Infektion mit PMEA behandelt. Nach elf Tagen wurde der zytopathische Effekt durch FeLV in 3201-Zellen gemessen. Dabei hemmten 6,81 – 16,3 µM PMEA den zytopathischen Effekt um mehr als 50 %. Allerdings beeinflussten diese Hemmstoffkonzentrationen die Zellviabilität. Nach elf Tagen war kein antiviraler Hemmeffekt in den FeLV-infizierten 3201-Zellen mehr nachweisbar (HOOVER et al., 1991).

Die antivirale Wirksamkeit von PMEA wurde auch bei Katzen untersucht. PMEA ist in wirksamen Hemmstoffkonzentrationen toxisch (hochgradige aregenerative Anämie). Daher kann keine Langzeittherapie mit PMEA gegen FeLV empfohlen werden (HARTMANN et al., 1992).

1.1.2.2. Tenofovir

Tenofovir ((R)-9-(2-Phosphonylmethoxyphenyl)Adenin, (R)-PMPA)) ist ebenfalls ein Adenosinanalogon und gehört zu den azyklischen

Nukleosidphosphonaten (PERTUSATI et al., 2014). Es wurde erstmalig 1993 beschrieben (BALZARINI et al., 1993). Tenofovir wird zur Behandlung von HIV- und HBV-infizierten Menschen eingesetzt (DE CLERCQ, 2009, 2011). Es entsteht im Körper aus dem zugelassenen Prodrug Tenofovirdisoproxil (TDF) (DE CLERCQ, 2009).

Die antivirale Wirksamkeit von TDF gegen FeLV wurde kürzlich untersucht. Die Zellen wurden zwei Stunden vor einer FeLV-Infektion mit TDF behandelt (Tabelle 7). Eine Zytotoxizität wurde erst bei einer Konzentration von mehr als 20 μM beobachtet. Diese Konzentration ist allerdings zehn Mal höher als die mittlere Hemmstoffkonzentration (GREGGS et al., 2012).

Tabelle 6: Wirksamkeit von Adefovir gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK-Zellen, Crandell-Rees feline kidney; Std., Stunden; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; µM; Mikromol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- Konzentration (µM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
61E	81C	24 Std. vorher	focus induction assay	1,63	> 50	4	HOOVER et al., 1991
61E	CrFK	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	1,63	> 50	4	HOOVER et al., 1991
61C	3201	24 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	6,81 – 16,3	> 50	4	HOOVER et al., 1991

Tabelle 7: Wirksamkeit von Tenofovir gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK-Zellen, Crandell-Rees feline kidney; Std., Stunden; µM, Mikromol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- Konzentration (µM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
61E/C	CrFK	2 Std. vorher	Durchflusszytometrie	2	50	2	GREGGS et al., 2012

1.1.3. Nicht-nukleosidische Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus

In der Humanmedizin sind NNRTI unter anderem (u. a.) für die Behandlung HIV-infizierter Menschen zugelassen (DE CLERCQ, 2009; ARTS & HAZUDA, 2012; DAS et al., 2012). NNRTI müssen nicht wie NRTI und NtRTI erst intrazellulär aktiviert werden. NNRTI werden nicht wie NRTI und NtRTI als „falsche“ Bausteine ins aktive Zentrum der RT eingebaut (RAVICHANDRAN, 2008), sondern binden nahe der Substratbindungsstelle für Nukleoside (XIA et al., 2007; DAS et al., 2012). Dadurch verändert sich die RT-Struktur, wodurch die Interaktion zwischen DNA-Primer und der RT-Polymerase-Domäne behindert (DE CLERCQ, 2009) und so die virale Vermehrung gehemmt wird (allosterische, nicht-kompetitive Hemmung) (DAS et al., 2012).

Bislang gibt es einen NNRTI, Foscarnet, dessen antivirale Wirksamkeit gegen FeLV untersucht wurde (SWENSON et al., 1990; SWENSON et al., 1991). Foscarnet wurde 1924 zum ersten Mal synthetisiert (HELGSTRAND et al., 1978). In der Humanmedizin ist Foscarnet von der FDA für die Behandlung der HIV-assoziierten Zytomegalievirus- und der Herpes-Simplex-Virus-Infektion zugelassen (WANG & SMITH, 2014). Da Foscarnet zu einer Niereninsuffizienz führen kann, sollte eine gleichzeitige Gabe mit potentiell nephrotoxischen Substanzen, wie Aminoglykoside, Amphotericin B und Ciclosporine, vermieden werden (FDA, 2015e).

Foscarnet ist ein Trinatriumsalz der Phosphonoameisensäure. Als Pyrophosphatanalogon inhibiert es die virale Replikation von DNA- und RNA-Viren (RENO et al., 1978; SUNDQUIST & OBERG, 1979; WANG & SMITH, 2014). Foscarnet unterdrückt die Virusvermehrung über eine Hemmung der Pyrophosphatbindungsstelle der DNA-Polymerase.

In einer *in-vitro*-Studie wurde die antivirale Wirksamkeit von Foscarnet gegen FeLV untersucht. Es wurden sowohl 3201-Zellen gleichzeitig mit FeLV infiziert und mit Foscarnet behandelt, als auch chronisch FeLV-infizierte FL74-Zellen. Foscarnet unterdrückte eine FeLV-Replikation in den Zellen. Dabei wurde in den chronisch infizierten FL74-Zellen zwar die RT-Aktivität unterdrückt, aber nicht die p27-Antigen-Produktion. Bei den gleichzeitig mit FeLV-infizierten und Foscarnet behandelten 3201-Zellen, wurde die p27-Antigen-Produktion gehemmt (Tabelle 8). Die mittlere Zytotoxizität wurde bei den 3201-Zellen bei 512 µM und

bei den FL74-Zellen bei 256 μM beobachtet (SWENSON et al., 1991).

Zehn bis 14 Wochen alte Katzen, die mit Foscarnet behandelt wurden, hatten keine vollständig entwickelten renalen Tubuli und Glomeruli. In sehr hohen Konzentrationen hat Foscarnet zu Veränderungen der Knochenstruktur geführt (SWENSON et al., 1990).

Tabelle 8: Wirksamkeit von Foscarnet gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; KT, Kawakami-Theilen; RT-Assay, Reverse Transkriptase-Assay; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; µM, Mikromol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (µM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studien
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
KT	81C	gleichzeitig	focal infectivity assay	64	63	10	SWENSON et al., 1991
KT	81C	gleichzeitig	focal infectivity assay	256	98	10	SWENSON et al., 1991
A/Rickard	3201	gleichzeitig	RT-Aktivität	1	> 70	10	SWENSON et al., 1991
A/Rickard	3201	gleichzeitig	RT-Aktivität	64 – 256	> 90	10	SWENSON et al., 1991
A/Rickard	3201	gleichzeitig	p27-Antigen-ELISA	128	37	10	SWENSON et al., 1991
A/Rickard	3201	gleichzeitig	p27-Antigen-ELISA	256	82	10	SWENSON et al., 1991
KT	FL74	chronisch infiziert	RT-Aktivität	16	> 50	10	SWENSON et al., 1991

1.2. Integrase-Hemmstoffe und deren Wirkmechanismus

Integraseinhibitoren (INI) hemmen das retrovirale Enzym Integrase (ARTS & HAZUDA, 2012). Derzeit sind zwei Integrasehemmstoffe (Raltegravir, Dolutegravir) für die Behandlung HIV-infizierter Menschen zugelassen (EMA, 2015c; 2015d; FDA, 2015a).

Die Integrase katalysiert den Einbau der viralen DNA in das Wirtszellgenom (GREGGS et al., 2012). Nach der reversen Transkription baut die Integrase an beiden Enden der viralen DNA Hydroxygruppen ein (SAVARINO et al., 2007; DE CLERCQ, 2009). Anschließend werden diese beiden Enden mit der Wirtszell-DNA verknüpft. So kann die virale DNA in das Wirtszellgenom integriert werden (ZEINALIPOUR-LOIZIDOU et al., 2007; DE CLERCQ, 2009). INI unterbinden den viralen Strangtransfer. Sie binden an das für die Integrase-Aktivität gebrauchte Magnesium-Ion der Integrase (Chelatkomplex) (ARTS & HAZUDA, 2012).

Bislang wurde der INI Raltegravir gegen FeLV *in vitro* untersucht (CATTORI et al., 2011; GREGGS et al., 2012) (Tabelle 9). In einer Studie wurden verschiedene Zellkulturen gleichzeitig mit FeLV-A/Glasgow-1 infiziert und Raltegravir behandelt (CATTORI et al., 2011). In einer weiteren Studie wurden CrFK-Zellen zwei Stunden vor einer FeLV-Infektion Raltegravir zugegeben (GREGGS et al., 2012). Zytotoxizitäten wurden erst ab einer 285-fach (4 µM) höheren Konzentration als die mittlere Hemmstoffkonzentration (0,014 µM) beobachtet (GREGGS et al., 2012). Raltegravir war in geringer Konzentration sehr wirksam gegen eine FeLV-Replikation. Raltegravir wird zum Teil über eine Glucuronidierung (Stoff-Ausscheidung durch Bindung an Glucuronsäure) ausgeschieden. Da dieser Mechanismus bei Katzen nur eingeschränkt abläuft, könnte Raltegravir in Katzen eventuell toxisch sein (CATTORI et al., 2011).

Tabelle 9: Wirksamkeit von Raltegravir gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; CrFK, Crandell-Rees feline kidney; FEA, feline embryonale Fibroblasten; Std., Stunden; qRT-PCR, quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction; μM , Mikromol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (μM)	Hemmung der FeLV- Replikation		Studien
					Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
A/Glasgow-1	QN10	gleichzeitig	qRT-PCR	0,0076	50	5	CATTORI et al., 2011
A/Glasgow-1	FEA	gleichzeitig	qRT-PCR	0,0013	50	7	CATTORI et al., 2011
A/Glasgow-1	CrFK	gleichzeitig	qRT-PCR	0,0022	50	7	CATTORI et al., 2011
61E/C	CrFK	2 Std. vorher	Durchflusszytometrie	0,014	50	2	GREGGS et al., 2011

1.3. Eintrittshemmstoffe und deren Wirkmechanismus

Eintrittshemmstoffe (entry inhibitors) hemmen den Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Dazu gehören die Fusionshemmstoffe und die „Attachment-Inhibitoren“ (Hemmung der Bindung des Virus an den Wirtszellrezeptor) (ARTS & HAZUDA, 2012).

1.3.1. Fusionshemmstoffe

Fusionshemmstoffe sind synthetische Peptide. Sie hemmen eine Bindung des Virus auf der Wirtszelloberfläche. Dadurch werden eine Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran und der Viruseintritt in die Wirtszelle verhindert (WILD et al., 1994; GIANNECCHINI et al., 2003; BOENZLI et al., 2011).

FeLV-A gelangt über den feline Wirtszellrezeptor feTHTR1 in eine Wirtszelle (MENDOZA et al., 2006). Dabei bindet das Glykoprotein (gp) auf der viralen Zelloberfläche an den Rezeptor auf der Wirtszelle (MENDOZA et al., 2006). Der Ablauf des FeLV-Eintritts in die Wirtszelle ist vermutlich ähnlich wie bei HIV (BOENZLI et al., 2011). Die Virushülle des HIV enthält zwei gp, das Oberflächenprotein gp120 und das Transmembranprotein (TM) gp41. Bei einer HIV-Infektion bindet das gp120 an einen CD4⁺-Rezeptor der T-Helfer-Zellen und den Chemokin-Korezeptor CCR5 oder CXCR4. Danach wird das TM gp41 frei, das die Wirtszellmembran durchdringt und eine Fusion zwischen der viralen und zellulären Membran ermöglicht (CHAN & KIM, 1998; ECKERT & KIM, 2001a).

Synthetische Peptide können direkt mit der viralen TM interferieren und eine stabile Fusion zwischen Virus und Wirtszelle verhindern (ECKERT & KIM, 2001a, 2001b). In der Humanmedizin ist seit 2003 der Fusionshemmstoff Enfuvirtid (T-20) für die Behandlung von HIV-Infektionen zugelassen (JIANG et al., 1993; WILD et al., 1993; WILD et al., 1994; LOMBARDI et al., 1996; GIANNECCHINI et al., 2003; FDA, 2015a). T-20 bindet an das TM gp41, wodurch die Fusion zwischen der viralen und zellulären Membran verhindert wird (WILD et al., 1993).

In einer aktuellen Studie wurde in FeLV-A/Glasgow-1-infizierten-Zellen untersucht, ob synthetische Peptide, die analog dem FeLV-15E-TM hergestellt wurden, einen FeLV-Eintritt in die Wirtszelle blockieren und so eine FeLV-Infektion verhindern können. Dafür wurden elf Fusions-Peptide hergestellt. Acht

dieser Peptide wurden N-terminal acetyliert (Acetylgruppe) und C-terminal aminiert (Aminogruppe) (EPK205, EPK206, EPK207, EPK208, EPK209, EPK210, EPK211, EPK237). Drei Peptide (EPK364, EPK397, EPK398) hatten ein freies C-terminales Ende. Am ersten Tag wurden die Zellen eine, drei und acht Stunden mit FeLV-A/Glasgow-1 inkubiert und dann mit den Peptiden behandelt. Das Zellkulturmedium wurde am dritten Tag komplett gegen frisches peptidhaltiges Medium und am sechsten Tag wurde die Hälfte des alten Mediums gegen frisches Medium ohne Peptide ausgetauscht. Am siebten Tag wurde das FeLV-p27-Antigen in den Überständen mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) quantifiziert. Dabei wurde der antivirale Effekt in den FEA-Zellen untersucht, da diese ein kontinuierliches Wachstum gezeigt haben (Tabelle 10). EPK364, ein Analogon des kommerziellen HIV-Fusionsinhibitors T-20, hemmte die FeLV-Replikation am stärksten. EPK205, EPK206, EPK207, EPK208, EPK209, EPK210 hatten keine antivirale Wirksamkeit gegen FeLV. EPK211 und EPK237 waren nur schwach antiviral wirksam. Die unterschiedliche Wirksamkeit der Peptide gegen eine FeLV-Vermehrung könnte an der unterschiedlichen Peptid-Länge gelegen haben. Die nicht oder nur schwach wirksamen Peptide bestanden aus 15 bis 25 Peptiden. Die wirksamen Peptide bestanden aus 37 Peptiden. Die kürzeren Peptide könnten instabiler als die längeren Peptide sein. Es wurde keine Toxizität der synthetischen Peptide auf die Zellen beobachtet (BOENZLI et al., 2011).

1.3.2. Sulfatierte Polysaccharide

Sulfatierte Polysaccharide sind „Attachment-Inhibitoren“. Sie kommen in Pflanzen, Tieren und Geweben vor (HOOPER et al., 1996) . Sie sind Bestandteile der Glykokalix und der Proteoglykane der extrazellulären Matrix (KAJIWARA & MIYAMOTO, 2005). Sie stellen die Kommunikation zwischen den Zellen, die Zelladhäsion, einen Schutz der Zellen und Gewebe vor äußeren Einflüssen und ein Reservoir für Wachstumsfaktoren her. Seit 1947 wird die antivirale Wirksamkeit von sulfatierten Polysacchariden untersucht (GINSBERG et al., 1947; GHOSH et al., 2009). Ihre antivirale Wirksamkeit ist abhängig von dem Grad der Sulfatierung und dem Molekulargewicht (GHOSH et al., 2009). Hoch sulfatierte Polysaccharide sind wirksamer. Je höher das Molekulargewicht, umso höher ist die antivirale Aktivität (WITVROUW & DE CLERCQ, 1997; GHOSH et al., 2009).

Dextransulfat (DS) ist ein hochmolekulares polysulfatiertes Polysaccharid

(CALLAHAN et al., 1991). Die antiretrovirale Wirksamkeit von DS wurde in vielen Studien, insbesondere gegen HIV, untersucht (ITO et al., 1987; NAKASHIMA et al., 1987; UENO & KUNO, 1987; BAGASRA & LISCHNER, 1988; CHANG et al., 1988; CLUMECK & HERMANS, 1988; MITSUYA et al., 1988; TOCHIKURA et al., 1988; ABRAMS et al., 1989; HAYASHI et al., 1990; PIRET et al., 2000). DS bindet an der HIV-gp120-Bindungsstelle der CD4⁺-Rezeptoren (LEDERMAN et al., 1989; PARISH et al., 1990) und an CCR5- und CXCR4-Korezeptoren (CALLAHAN et al., 1991). Dadurch wird eine Bindung von HIV an die Wirtszelle verhindert (LEDERMAN et al., 1989). In einer HIV-Studie war orales DS allerdings nur wenig antiviral wirksam (LORENTSEN et al., 1989; FLEXNER et al., 1991). In einer anderen Studie war der Virusgehalt durch intraperitoneal appliziertes weiterentwickeltes DS (Dextrin-2-Sulfat) geringer und die HIV-Replikation konnte unterdrückt werden (SHAUNAK et al., 1998).

Bislang ist nicht bekannt, wie DS gegen FeLV wirkt. *In vitro* wurde die antivirale Wirksamkeit von DS in FeLV-infizierten 3201-Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen 48 Stunden vor und zwei Stunden nach der FeLV-Infektion mit DS behandelt. 10 µg/ml DS unterdrückten eine FeLV-Vermehrung um mehr als 70 % (Tabelle 11). Für Katzen verträgliche Hemmstoffkonzentrationen sind kaum gegen FeLV wirksam. Wirksame Hemmstoffkonzentrationen sind toxisch (hochgradige Degeneration und Nekrose des Darmes, Anämie, Lethargie, Anorexie) (MATHES et al., 1991).

Tabelle 10: Wirksamkeit von synthetischen Peptiden gegen FeLV *in vitro* (FeLV, felines Leukämievirus; FEA, feline embryonale Fibroblasten; Std., Stunden; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; μM , Mikromol)

FeLV	Zellen	Synthetisches Peptid	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoffkonzentration (μM)	Hemmung der FeLV-Replikation		Studie
						Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
A/Glasgow-1	FEA	EPK364	3 Std. nachher	p27-Antigen-ELISA	12	88	7	BOENZLI et al., 2011
A/Glasgow-1	FEA	EPK397	3 Std. nachher	p27-Antigen-ELISA	12	58	7	BOENZLI et al., 2011
A/Glasgow-1	FEA	EPK398	3 Std. nachher	p27-Antigen-ELISA	12	27	7	BOENZLI et al., 2011

Tabelle 11: Wirksamkeit von Dextransulfat gegen FeLV *in vitro* (FeLV, Felines Leukämievirus; KT, Kawakami-Theilen; Std., Stunden; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; μM , Mikromol; *, Konzentration in Mikromol bei einem Molekulargewicht von 7000 Gramm pro Mol)

FeLV	Zellen	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoffkonzentration (μM)	Hemmung der FeLV-Replikation		Studie
					Hemmung (%)	Tage nach Infektion	
KT	3201	48 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,0014*	> 70	10	MATHES et al., 1991
KT	3201	48 Std. vorher	p27-Antigen-ELISA	0,0007*	> 40	10	MATHES et al., 1991

2. Wirksamkeit von RNA-Interferenz auf eine Vermehrung feliner Viren *in vitro*

Eine RNA-Interferenz (RNAi) wurde 1998 erstmalig in Nematoden gezeigt (FIRE et al., 1998). RNAi ist ein sequenzspezifischer „Gen-Stillegungsprozess“ („Gen-Silencing“), bei welchem kurze RNA-Fragmente durch Bindung an eine komplementäre Zielsequenz eine Genexpression unterdrücken (KETZINEL-GILAD et al., 2006). RNAi schützt die Erbinformation vor exogenen Einflüssen und reguliert die Genexpression. In Pflanzen dient dieser Mechanismus als natürliche Abwehr gegen Viren (MATZKE et al., 2001; VANCE & VAUCHERET, 2001). RNAi wurde auch in Pilzen, Insekten und Säugetieren entdeckt (MA et al., 2007).

RNAi wird als Ansatz in vielen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien für die Behandlung viraler Infektionen untersucht (MA et al., 2007). *In vitro* kann die Vermehrung vieler für den Mensch pathogener Viren (z. B. HIV, HBV, Hepatitis-C-Virus (HCV), aviärer Influenza-A-Viren (CAPODICI et al., 2002; PARK et al., 2002; WU et al., 2007; ZHANG et al., 2009; MOTAVAF et al., 2012; MARIMANI et al., 2013) und für Tiere pathogene Viren (z. B. FIV, FeLV, FCoV, FHV-1, canine Parvovirus) (BABA et al., 2007; BABA et al., 2008; WILKES & KANIA, 2009; MCDONAGH et al., 2011; HE et al., 2012; ORNELAS et al., 2012) durch RNAi gehemmt werden. Auch *in vivo* wurde die HIV-, HCV- und Influenza-A-Virus-Infektion in Mäusen und HIV in Primaten durch RNAi gehemmt (MCCAFFREY et al., 2002; TOMPKINS et al., 2004; AN et al., 2007; TER BRAKE et al., 2009; KIM et al., 2010; RAJPUT et al., 2012).

2.1. Moleküle der RNA-Interferenz

Der RNAi-Mechanismus kann durch zwei Moleküle ausgelöst werden. Dazu gehören die siRNAs (ELBASHIR et al., 2001a) und die short hairpin RNAs (shRNAs) (RAO et al., 2009).

2.1.1. Small interfering RNA und deren Wirkmechanismus

Der RNAi-Mechanismus wird in zwei Phasen unterteilt, in die Initiations- und Effektorphase (SONTHEIMER, 2005; MA et al., 2007) (Abbildung 2). Während der Initiationsphase werden posttranskriptional lange, von endogenen Genen, Viren, Transposomen oder experimentellen Transgenen produzierte dsRNAs

(KETZINEL-GILAD et al., 2006) von einem dsRNA-bindenden Protein (RDE-4/R2D2) erkannt (TABARA et al., 2002; LIU et al., 2003). Daraufhin werden diese dsRNAs von dem Enzym Dicer, einer RNase III-ähnlichen Nuklease (Endoribonuklease), in 21- bis 23- Nukleotid-lange dsRNAs (siRNAs) gespalten (BERNSTEIN et al., 2001; MA et al., 2007). Diese siRNAs haben einen Überhang aus zwei Nukleotiden (BLASZCZYK et al., 2001) ein 5'-Monophosphat- und 3'-Hydroxy-Ende (ELBASHIR et al., 2001a).

Für die folgende Effektorphase wird die entwundene siRNA (ZAMORE et al., 2000) in dem Nuklease-Enzymkomplex „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut (HAMMOND et al., 2000). Der Leitstrang der siRNA bindet über Basenpaare an die Ziel-mRNA (SONTHEIMER, 2005). Als Leitstrang wird der thermodynamisch instabilere Strang am 5'-Ende ausgewählt (SCHWARZ et al., 2003; SONTHEIMER, 2005). Der Begleitstrang der siRNA wird aus dem RISC entlassen und abgebaut (SCHWARZ et al., 2003). Die Ziel-mRNA wird dann durch eine Enzym-Untereinheit im RISC (Argonaute 2) gespalten (ELBASHIR et al., 2001a; MA et al., 2007) und abgebaut (ELBASHIR et al., 2001a).

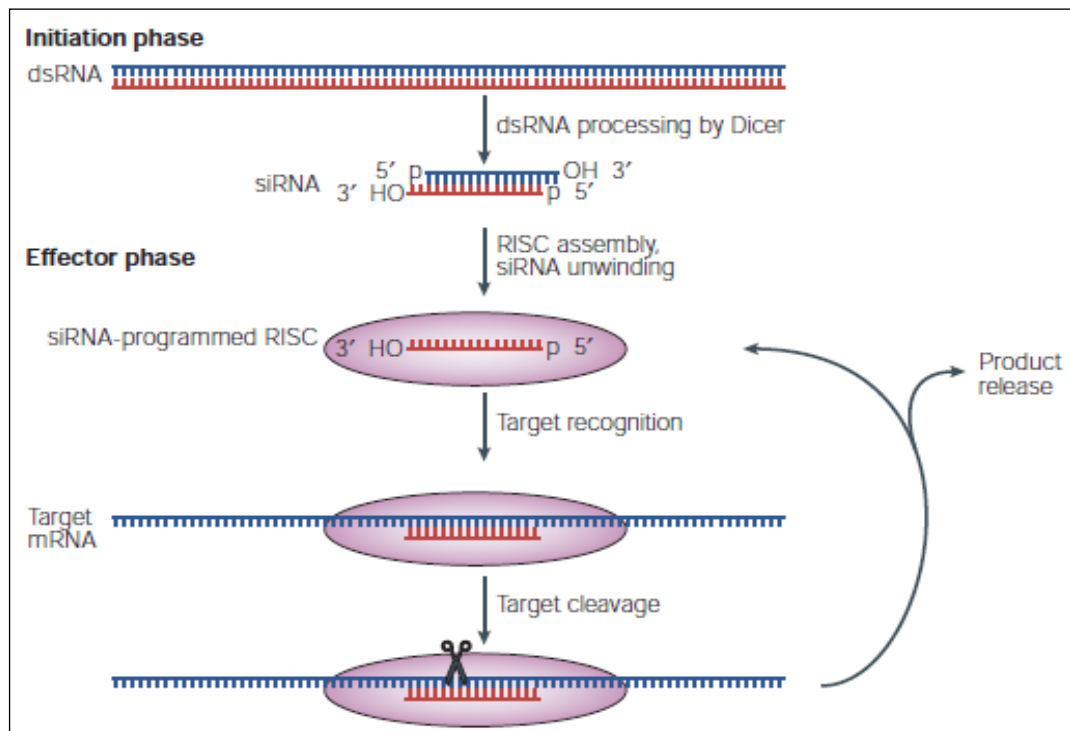


Abbildung 2 (SONTHEIMER et al., 2005): Entstehung einer siRNA in der Initiations- und Effektorphase. In der Initiationsphase („Initiation phase“) wird eine dsRNA von dem Enzym Dicer in 21- bis 23-Nukleotid-lange siRNA gespalten („dsRNA processing by Dicer“). Die siRNA („siRNA“) hat am 5'-Ende eine Phosphatgruppe („5' p“) und am 3'-Ende einen Überhang aus zwei Nukleotiden und einer Hydroxygruppe („3' OH“). In der folgenden Effektorphase („Effector phase“) wird die entwundene siRNA („RISC assembly, siRNA unwinding“) vom Enzymkomplex RISC aufgenommen, der komplementäre siRNA-Strang an die Zielsequenz gebunden („Target recognition“, „Target mRNA“) und in diesem Bereich gespalten („Target cleavage“).

Spezifisch synthetisierte siRNAs können eine Vermehrung vieler DNA- und RNA-Viren hemmen (KETZINEL-GILAD et al., 2006). SiRNAs werden bereits in einer Länge von 21 Nukleotiden hergestellt. Dadurch entfällt der Prozess, in dem durch das Enzym Dicer aus dsRNA-Molekülen siRNAs gebildet werden (RAO et al., 2009) (Abbildung 3). 23-, 25-, oder 27-Nukleotid-lange RNAs werden wie oben beschrieben von dem Enzym Dicer intrazellulär im Zytoplasma zu 21-Nukleotid-langen siRNAs verarbeitet (KIM et al., 2005).

2.1.2. Short hairpin RNA und deren Wirkmechanismus

ShRNAs sind kurze, aus 19 bis 21 Nukleotiden bestehende, Haarnadelschleifenstrukturartige RNA-Moleküle. Sie werden über Vektoren (Plasmide, Viren oder Bakterien) in den Zellkern eingeschleust (Transduktion) (CULLEN, 2005; RAO et al., 2009). Nach Integration des shRNA-kodierenden Vektors im Genom, wird die shRNA transkribiert. Danach wird durch das Enzym Drosha (RNase III) ein shRNA-Primärkomplex gebildet (ZHANG et al., 2002; RAO et al., 2009), der anschließend über das Transportprotein Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert wird (LEE et al., 2002; CULLEN, 2004). Dort wird die vorläufige shRNA von dem Enzym Dicer aufgenommen und zu einer siRNA verarbeitet (YI et al., 2003; LEE et al., 2004; LUND et al., 2004). Im Enzymkomplex RISC bindet der siRNA-Leitstrang komplementär die Ziel-mRNA, die dann gespalten und abgebaut wird. Bei einer nicht vollständigen Komplementarität der shRNA zu der Ziel-mRNA wird die Translation der Ziel-mRNA verhindert (KUTTER & SVOBODA, 2008; MOORE et al., 2010) (Abbildung 3).

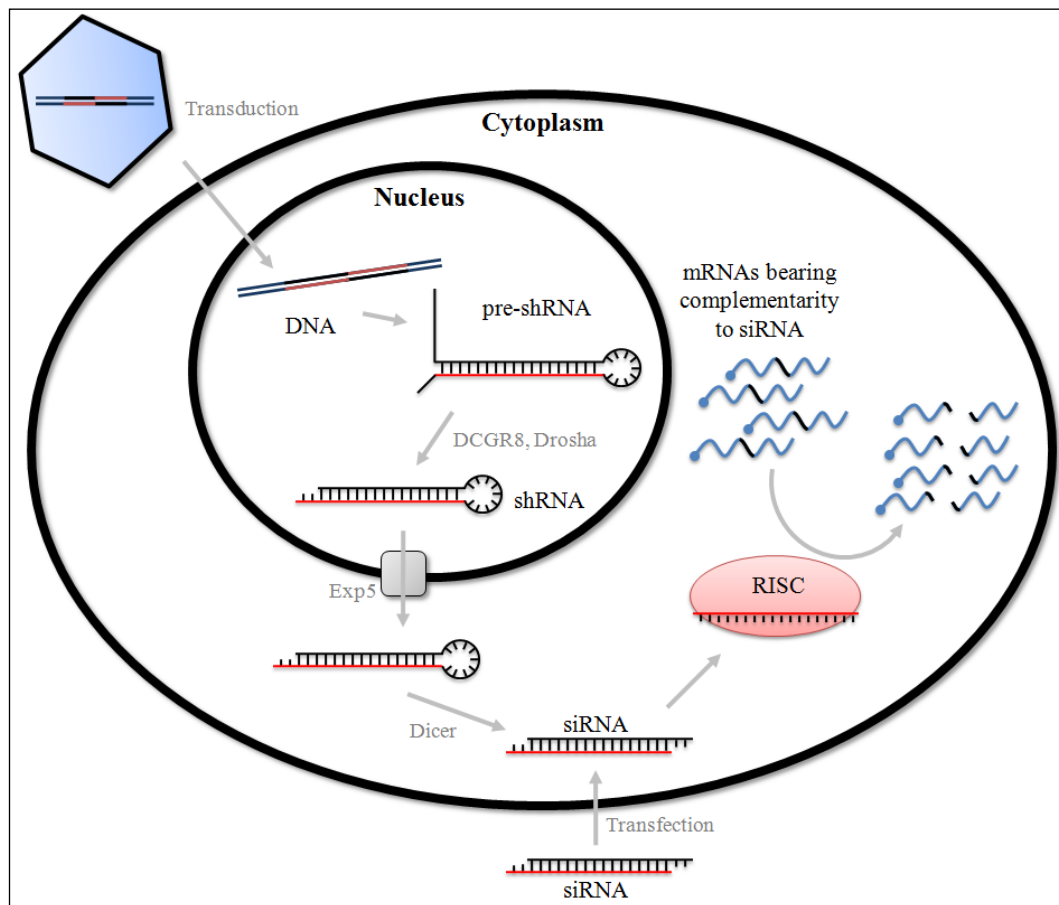


Abbildung 3 (O' KEEFE, 2015): Entstehungsmechanismus von siRNA und shRNA. Die shRNA wird über einen Vektor in die Zelle eingeschleust, in die zelluläre DNA integriert („Transduction“), transkribiert und enzymatisch („DCGR8, Drosha“) zu einer vorläufigen shRNA („pre-shRNA“) weiterverarbeitet. Über das Transportprotein Exportin-5 („Exp5“) gelangt die shRNA in das Zytoplasma. Dort wird die shRNA von dem Enzym Dicer aufgenommen und zu einer siRNA entwickelt. Diese siRNA oder die exogen transfizierten siRNAs („Transfection“) binden im Enzymkomplex RISC komplementär die Ziel-mRNA („mRNAs bearing complementary to siRNA“), die daraufhin gespalten und abgebaut wird.

SiRNAs und shRNAs können mit einer viralen Replikation interferieren. Ihr Mechanismus unterscheidet sich. ShRNAs werden über einen Vektor oder Plasmid in eine zelluläre DNA eingeschleust, transkribiert und enzymatisch zu einer siRNA verarbeitet. Durch die stetige Expression könnte eine kontinuierliche Unterdrückung einer viralen RNA erreicht werden. Allerdings kann durch diese

dosisunabhängige und kontinuierliche siRNA-Expression auch eine Überexpression geschehen. Dadurch werden unspezifische Nebenwirkungen durch das Immunsystem provoziert (BRIDGE et al., 2003). Eine siRNA wird in einer bestimmten Konzentration zu den Zellen gegeben und nicht in die zelluläre DNA integriert. Eine siRNA wird nach circa (ca.) 48 Stunden abgebaut. Aufgrund der in zahlreichen Studien unterschiedlich angewandter Methoden, z. B. unterschiedlich verwendete Zellkulturen, verschiedene Viren, unterschiedliche Mess- und Auswertungsmethoden, unterschiedliche Infektions- und Therapiezeitpunkte, ist ein genauer Vergleich des antiviralen Hemmpotentials zwischen siRNA und shRNA schwer möglich (RAO et al., 2009).

2.2. Hemmung feliner Viren durch RNA-Interferenz *in vitro*

In einigen *in-vitro*-Studien wurde die antivirale Wirksamkeit von RNAi auf die Vermehrung feliner Viren untersucht. Durch siRNA und shRNA wurde die Replikation feliner Viren unterdrückt (BABA et al., 2007; BABA et al., 2008; WILKES & KANIA, 2009; MCDONAGH et al., 2011; ORNELAS et al., 2012).

2.2.1. Hemmung der Vermehrung des feline Immunschwächevirus

In einer Studie wurde der Einfluss von vier siRNAs (G1, G2, G3, G4) auf FIV-infizierte CrFK-Zellen untersucht. Die siRNAs wurden analog zum FIV-*gag*-Gen hergestellt. Ab 48 Stunden wurde eine antivirale Wirksamkeit der siRNAs auf die FIV-Replikation beobachtet. Drei der vier siRNAs (G1, G3, G4) unterdrückten signifikant die FIV-Vermehrung. Der virale RNA-Gehalt und die RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen der siRNA-behandelten Zellen waren im Vergleich zu den Kontrollen um ca. 40 % bis 90 % geringer. Nach 48 ließ der Hemmeffekt kontinuierlich nach (BABA et al., 2007) (Tabelle 12).

In der gleichen Studie wurde die Wirksamkeit einer gegen das *gag*-Gen hergestellten shRNA (shG4) untersucht. Diese wurde mit einem MuLV-Vektor in chronisch FIV-infizierte T-Zellen (FL4) eingeschleust. Nach 15 Tagen war der virale RNA-Gehalt in den FL4-Zellen und die RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen im Vergleich zu den Kontrollen um ca. 70 % geringer (BABA et al., 2007) (Tabelle 13).

In einer anderen Studie wurde in akut und chronisch infizierten feline Zellen die antivirale Wirksamkeit von einer shRNA analog zum FIV-*gag*-Gen untersucht. Die shRNA wurden mit einem HIV-1-Vektor in den Zellkern geschleust. Die RT-

Aktivität in den Überständen der shRNA-behandelten Zellen war nach 15 bis 27 Tagen signifikant geringer als in den Überständen der Kontrolle (Tabelle 13). Nach 30 Tagen war keine Hemmaktivität mehr messbar (BABA et al., 2008).

In einem weiteren Versuch wurden Zellen vor einer FIV-Infektion über einen HIV-1-Vektor mit einer shRNA transfiziert. Der Gehalt der proviralen DNA in den behandelten Zellen und in der Kontrolle war nach der Behandlung gleich. Die Zellen konnten prophylaktisch also nicht vor einer FIV-Infektion geschützt werden. Die RT-Aktivität in den behandelten Zellen war im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle allerdings geringer. Durch die shRNA wurde zwar nicht die Integration des FIV in die zelluläre DNA verhindert, aber die FIV-Replikation (BABA et al., 2008).

Tabelle 12: Wirksamkeit von siRNAs gegen FIV *in vitro* (FIV, Felines Immunschwächevirus; CrFK, Crandell-Rees feline kidney; siRNA, small interfering ribonucleic acid gegen das FIV-*gag*-Gen; Std., Stunden; RT-Aktivität, Reverse Transkriptase Aktivität; qRT-PCR; quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction; μM ; Mikromol)

FIV	Zellen	siRNA	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FIV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (μM)	Hemmung der FIV- Replikation		Studie
						Hemmung (%)	Tage nach Infektion	
Petaluma	CrFK	G1	24 Std. nachher	RT-Aktivität	0,2	40	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G3	24 Std. nachher	RT-Aktivität	0,2	> 60	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	RT-Aktivität	0,2	> 70	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	RT-Aktivität	0,04	50	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	RT-Aktivität	1	> 90	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	qRT-PCR	0,04	40	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	qRT-PCR	1	> 90	2	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	RT-Aktivität	0,2	40	4	BABA et al., 2007
Petaluma	CrFK	G4	24 Std. nachher	RT-Aktivität	1	60	4	BABA et al., 2007

Tabelle 13: Wirksamkeit von shRNA gegen FIV *in vitro* (FIV, Felines Immunschwächevirus; shRNA, short hairpin ribonucleic acid gegen das FIV-gag-Gen; CrFK, Crandell-Rees Feline Kidney; MuLV, Murines Leukämievirus; HIV-1; Humanes Immunschwächevirus-1; RT-Aktivität, Reverse Transkriptase Aktivität; qRT-PCR; quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction; MuLV, murines Leukämievirus; HIV-1, humanes Immunschwächevirus-1)

FIV	Zellen	shRNA	shRNA-Vektor	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FIV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Hemmung der FIV-Replikation		Studie
						Hemmung (%)	Tage nach Infektion	
Petaluma	FL4	shG4	MuLV	chronisch infiziert	RT-Aktivität	> 70	14	BABA et al., 2007
Petaluma	FL4	shG4	MuLV	chronisch infiziert	qRT-PCR	> 70	14	BABA et al., 2007
UK8 ^{low}	3201	shGag	HIV-1	chronisch infiziert	RT-Aktivität	> 60	10	BABA et al., 2008
UK8 ^{high}	3201	shGag	HIV-1	chronisch infiziert	RT-Aktivität	> 70	10	BABA et al., 2008
Petaluma	FL4	shGag	HIV-1	chronisch infiziert	RT-Aktivität	> 80	10	BABA et al., 2008
Petaluma	CrFK	shGag	HIV-1	chronisch infiziert	RT-Aktivität	> 70	10	BABA et al., 2008

2.2.2. Hemmung der Vermehrung des felineen Coronavirus

In einer Studie wurde das antivirale Hemmpotential von acht siRNAs gegen das FCoV *in vitro* getestet. Die siRNAs wurden komplementär zu vier verschiedenen Regionen des FCoV-Genoms, gegen strukturelle Gene der Virusmembran (M1, 2) und gegen das Nukleokapsid (N1, 2), gegen das nicht-strukturelle Replikase-Gen (R1, 2) und gegen die nicht übersetzte „5'-leader-Sequenz“ (L1, 2) hergestellt. Das „spike-Protein“ (virales Oberflächenprotein) wurde wegen seiner genetischen Vielfältigkeit nicht als Zielgen für die siRNAs verwendet. CrFK-Zellen wurden 24 Stunden nach Kultivierung mit den siRNAs transfiziert. Nach sechs Stunden wurden die Zellen mit einem hochvirulenten FCoV-Stamm (FIPV WSU 79-1146) infiziert. Nach einer Stunde wurde das Zellkulturmedium gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 24 Stunden wurde der Einfluss der siRNAs auf eine virale Replikation untersucht. Die Virusvermehrung wurde in den siRNA-behandelten Zellen um ca. 23 – 97 % gehemmt. Alle siRNAs hemmten die FCoV-Vermehrung. Die Hemmung der FCoV-Replikation durch siRNAs gegen das Nukleokapsid (N1) und der „5'-leader-Sequenz“ (L2) war am effektivsten (Tabelle 14). Mittels Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass auch die Produktion viraler Proteine durch die siRNAs unterdrückt wurde. SiRNA-Konzentrationen von 0,1 µM waren minimal toxisch (MCDONAGH et al., 2011).

2.2.3. Hemmung der Vermehrung des felineen Herpesvirus

In CrFK-Zellen wurde die Wirksamkeit von 21- (G1, G2, G3) und 27- (gD1, gD2, gD3) Nukleotid-langen siRNAs gegen das FHV-1-gpD untersucht (WILKES & KANIA, 2009). Dafür wurden die Zellen 24 Stunden vor einer FHV-1-Infektion mit den siRNAs transfiziert. Eine Stunde später wurde das Zellkulturmedium gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 48 Stunden wurde der Einfluss von den siRNAs auf die FHV-1-Vermehrung untersucht. Dabei wurde FHV-1-Vermehrung am stärksten durch die siRNAs G3 und gD1 gehemmt (WILKES & KANIA, 2009) (Tabelle 15).

Die antivirale Wirksamkeit wurde spezifisch durch die siRNAs hervorgerufen und nicht durch eine unspezifische Immunstimulation. Dafür wurde die mRNA von Interferon-beta (IFN-β) mittels „quantitative real time reverse transcriptase polymersae chain reaction“ (qRT-PCR) quantifiziert. IFN-β hatte keinen Einfluss auf die Hemmung der FHV-1-Vermehrung (WILKES & KANIA, 2009).

Eine Konzentration von 0,1 μM der 21-Nukleotid-langen und 0,05 μM der 27-Nukleotid-langen siRNA waren geringgradig zytotoxisch (milde Granulierung). Eine Konzentration von 0,1 μM der 27-Nukleotid-langen siRNAs war zytotoxisch. Es ist unklar, ob diese Effekte einen Einfluss auf die antivirale Wirksamkeit gehabt haben könnten (WILKES & KANIA, 2009).

2.2.4. Hemmung der Vermehrung des feline Leukämievirus

Die Wirksamkeit von shRNAs wurde gegen eine FeLV-Vermehrung *in vitro* untersucht. Dafür wurden CrFK-Zellen mit FeLV infiziert und zeitgleich mit drei shRNAs (F1, F2, F3), komplementär zum *gag*-Gen von FeLV-A/Rickard behandelt. Diese shRNAs wurden über einen pSUPER Vektor (H1-Polymerase-III-Promoter) in die infizierten Zellen gebracht. Danach wurde ein lentiviraler (HIV-1)-Vektor mit der wirksamsten shRNA (F2) beladen und in humane T-Zellen eingeschleust. Nach 16 Stunden wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Die antivirale Wirksamkeit der shRNAs gegen die FeLV-Replikation wurde nach 48 Stunden untersucht. Zuletzt wurden die shRNAs über den HIV-Vektor in chronisch FeLV-infizierte 3201-Zellen eingebracht. Nach 48 Stunden wurden die Zellen zwei Mal gewaschen und nach 15 Tagen die Wirksamkeit der shRNA gegen FeLV getestet. Die F2-shRNA zeigte das stärkste Hemmpotential (Tabelle 16). F3 war kaum wirksam. Unspezifische Interferenzen und technische Fehler könnten die Wirksamkeit von F3 beeinflusst haben (ORNELAS et al., 2012).

Tabelle 14: Wirksamkeit von siRNAs gegen FCoV *in vitro* (FCoV, Felines Coronavirus; *, hochvirulenter Stamm FIPV WSU 79-1146; CrFK, Crandell-Rees feline kidney; siRNA, small interfering ribonucleic acid gegen die „5′-leader-Sequenz (L2)“ und das Nukleokapsid (N2); Std., Stunden; qRT-PCR, quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction; TCID50, Tissue Culture Infection Dose Assay, 50%ige infektiöse Dosis; µM; Mikromol; vRNA, virale RNA; M, messenger ribonucleic acid der Virusmembran; NK, messenger ribonucleic acid des Nukleokapsids; vT, extrazellulärer Virustiter)

FCoV	Zellen	siRNA	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FCoV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (µM)	Hemmung der FCoV- Replikation		Hemmpotential gegen die FIV-Replikation
						Hemmung (%)	Tage nach Infektion	
*	CrFK	L2	6 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	> 90 (vRNA)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	L2	6 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	> 90 (M)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	L2	6 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	> 90 (NK)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	L2	6 Std. vorher	TCID50	0,005	82 (vT)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	L2	6 Std. vorher	TCID50	0,1	> 90 (vT)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	L2	6 Std. vorher	TCID50	0,2	94 (vT)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	N1	6 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	> 90 (vRNA)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	N1	6 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	> 90 (M)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	N1	6 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	> 90 (NK)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	N1	6 Std. vorher	TCID50	0,005	83 (vT)	1	MCDONAGH et al., 2011

*	CrFK	N1	6 Std. vorher	TCID50	0,1	> 90 (vT)	1	MCDONAGH et al., 2011
*	CrFK	N1	6 Std. vorher	TCID50	0,2	97 (vT)	1	MCDONAGH et al., 2011

Tabelle 15: Wirksamkeit von siRNAs gegen FHV-1 *in vitro* (FHV-1-gpD, Felines Herpesvirus-1-Glykoprotein D; CrFK, Crandell-Rees Feline Kidney; siRNA, small interfering ribonucleic acid gegen das feline Herpes-Virus-1-Glykoprotein D; Std., Stunden; qRT-PCR, quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction; μM , Mikromol; \pm , mittlere Standardabweichung; ^a, messenger ribonucleic acid-Expression des felines Herpesvirus-1-Glykoprotein D; ^b, Herpesvirus-1-Glykoprotein D-Produktion; ^c, feline Herpesvirus-1-Replikation)

FHV-1	Zellen	siRNA	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FHV-1-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Wirksame Hemmstoff- konzentration (μM)	Hemmpotential gegen FHV-1-Vermehrung		Studie
						Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
FHV-1	CrFK	gD1	24 Std. vorher	qRT-PCR	0,05	77 ± 7^a	2	WILKES & KANIA., 2009
FHV-1	CrFK	gD1	24 Std. vorher	Durchflusszytometrie	0,05	27 ± 3^b	2	WILKES & KANIA., 2009
FHV-1	CrFK	gD1	24 Std. vorher	Plaque-Assay	0,05	84 ± 6^c	2	WILKES & KANIA., 2009
FHV-1	CrFK	G3	24 Std. vorher	qRT-PCR	0,1	85 ± 7^a	2	WILKES & KANIA., 2009
FHV-1	CrFK	G3	24 Std. vorher	Durchflusszytometrie	0,1	43 ± 8^b	2	WILKES & KANIA., 2009
FHV-1	CrFK	G3	24 Std. vorher	Plaque-Assay	0,1	77 ± 19^c	2	WILKES & KANIA., 2009

Tabelle 16: Wirksamkeit von shRNAs gegen FeLV *in vitro* (FeLV, Felines Leukämievirus; CrFK, Crandell-Rees Feline Kidney; shRNA, short hairpin ribonucleic acid gegen das *gag*-Gen des felines Leukämievirus-A/Rickard; HIV-1; humanes Immunschwächevirus-1; RT-Aktivität, Reverse Transkriptase Aktivität)

FeLV	Zellen	shRNA-Vektor	shRNA	Therapiebeginn vor/gleichzeitig/nach FeLV-Infektion der Zellen	Nachweismethode	Hemmung gegen die FeLV-Vermehrung		Studie
						Hemmung (%)	Tag nach Infektion	
61E/C	CrFK	pSUPER	F1	gleichzeitig	Immunoblot	> 40	2	ORNELAS et al., 2012
61E/C	CrFK	pSUPER	F1	gleichzeitig	RT-Aktivität	> 40	2	ORNELAS et al., 2012
61E/C	CrFK	pSUPER	F2	gleichzeitig	Immunoblot	> 70	2	ORNELAS et al., 2012
61E/C	CrFK	pSUPER	F2	gleichzeitig	RT-Aktivität	> 60	2	ORNELAS et al., 2012
61E/C	3201	HIV-1	F2	chronisch infiziert	RT-Aktivität	> 70	15	ORNELAS et al., 2012

III. PUBLIKATION

Wirksamkeit von siRNA auf die Vermehrung des feline Leukämievirus *in vitro*

Melanie Lehmann¹

Karin Weber¹

Gisep Rauch²

Regina Hofmann-Lehmann³

Marina L. Meli³

Margaret J. Hosie⁴,

Katrin Hartmann¹

¹Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, München

²Institut für Evolution und Biodiversität, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

³Veterinärmedizinisches Labor, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

⁴University of Glasgow, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, Glasgow, Schottland, United Kingdom

Publikation in der Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 128, 209 – 217 (2015)

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 128,
209–217 (2015)
DOI 10.2376/0005-9366-128-209

© 2015 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
m.lehmann@medizinische-kleintierklinik.de

Eingegangen: 26.02.2014
Angenommen: 27.08.2014

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2015/12805-209 \$ 15.00/0

Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München¹
Institut für Evolution und Biodiversität, Westfälische Wilhelms-Universität Münster²
Veterinärmedizinisches Labor, Universität Zürich³
University of Glasgow, Institute of Infection, Immunity and Inflammation⁴

Wirksamkeit von siRNA auf die Vermehrung des feline Leukämievirus in vitro

Efficacy of siRNA on feline leukemia virus replication in vitro

Melanie Lehmann¹, Karin Weber¹, Glsep Rauch², Regina Hofmann-Lehmann³,
Margaret J. Hosie⁴, Marina L. Meli⁴, Katrin Hartmann¹

Katzen, die mit feline Leukämieviren (FeLV) infiziert sind, können schwere Krankheits-symptome entwickeln. Bis heute gibt es keine wirksamen Medikamente für die Behandlung FeLV-infizierter Katzen. Eine neue Therapiemöglichkeit sind small interfering RNA (siRNA). siRNAs sind kurze RNA-Moleküle, die post-transkriptionell einen komplementären Strang des Zielgens binden und dadurch spezifisch zur Spaltung der mRNA führen. Viele Studien haben nachgewiesen, dass siRNAs in der Lage sind, auf diese Weise eine Virusvermehrung zu unterdrücken. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob siRNAs eine FeLV-Vermehrung in vitro verhindern können. Hierfür wurden spezifische siRNAs verwendet, die gegen das FeLV-*env*-Gen und gegen den Wirtszellrezeptor (feTHR1), den das FeLV-A für den Eintritt in die Wirtszelle benutzt, gerichtet sind, sowie unspezifische, nicht an das FeLV- und Katzen-genom bindende siRNAs. Crandell-feline-kidney-Zellen (CrFK-Zellen) wurden mit dem FeLV-A/Glasgow-1 infiziert und nach 13 Tagen mit den siRNAs behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte FeLV-infizierte Zellen und mit Azidothymidin (AZT) (5 µg/ml) behandelte Zellen verwendet. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurde jeweils die Menge viraler RNA mittels RT-PCR sowie die Menge des viralen Antigens p27 mittels ELISA in Zellkulturüberständen bestimmt. Bereits nach 48 Stunden wurde ein signifikant geringerer Gehalt viraler RNA und p27-Antigen in den Zellkulturüberständen derjenigen Zellen nachgewiesen, die mit siRNAs behandelt wurden. Alle siRNAs unterdrückten die FeLV-Replikation. Da auch die nicht-komplementären siRNAs eine Hemmung verursachten, ist die Hemmung wahrscheinlich vorwiegend auf unspezifische Mechanismen zurückzuführen.

Schlüsselwörter: small interfering RNA, FeLV, Therapie, RNA-Interferenz

Feline leukemia virus (FeLV) can lead to severe clinical signs in cats. Until now, there is no effective therapy for FeLV-infected cats. RNA interference-based antiviral therapy is a new concept. Specific small interfering RNA (siRNA) are designed complementary to the mRNA of a target region, and thus inhibit replication. Several studies have proven efficacy of siRNAs in inhibiting virus replication. The aim of this study was to evaluate the inhibitory potential of siRNAs against FeLV replication in vitro. siRNAs against the FeLV *env* gene and the host cell surface receptor (feTHR1) which is used by FeLV-A for entry as well as siRNA that were not complementary to the FeLV or cat genome, were tested. Crandell feline kidney cells (CrFK cells) were transfected with FeLV-A/Glasgow-1. On day 13, infected cells were transfected with siRNAs. As control, cells were mock-transfected or treated with azidothymidine (AZT) (5 µg/ml). Culture supernatants were analyzed for FeLV RNA using quantitative real-time RT-PCR and for FeLV p27 by ELISA every 24 hours for five days.

All siRNAs significantly reduced viral RNA and p27 production, starting after 48 hours. The fact that non-complementary siRNAs also inhibited virus replication may lead to the conclusion that unspecific mechanisms rather than specific binding lead to inhibition.

Keywords: small interfering RNA, FeLV therapy, RNA interference

Einleitung

Das feline Leukämievirus (FeLV) ist ein Gammaretrovirus, das bei infizierten Katzen Knochenmarksuppression, Immunsuppression und Tumore hervorrufen kann. Bis heute gibt es keine nachweislich wirksame Therapie gegen die FeLV-Infektion. Viele antivirale Medikamente haben Nebenwirkungen. Das Thymidinanalogen Azidothymidin (AZT) wird bei Menschen für die Behandlung einer Infektion mit dem humanen Immunschwächenvirus (HIV) verwendet, aber auch zur Therapie FeLV-infizierter Katzen eingesetzt. Bei Katzen kann AZT jedoch zu Nebenwirkungen führen, wobei insbesondere aregenerative Anämien beobachtet werden (Tavares et al., 1987; Hoover et al., 1990; Hartmann et al., 1992).

Einen neuen Therapieansatz könnten kurze RNA-Moleküle, sogenannte small interfering RNA (siRNA), darstellen. Pflanzen schützen sich durch die Produktion von siRNAs vor viralen Infektionen. Dabei werden durch das Enzym Dicer aus größeren RNA-Abschnitten kurze, aus circa 21–23 Nukleotiden bestehende siRNAs gebildet. Diese doppelsträngigen siRNAs werden dann in einem Enzymkomplex (RNA-induced silencing complex, RISC) in Einzelstränge gespalten. Dabei bindet einer der Stränge (Leitstrang) über Basenpaare an der komplementären Zielsequenz der mRNA. Durch die spezielle Endonukleasekomponente der siRNA wird das komplementäre Stück gespalten. Dies verhindert eine Translation zum Protein und führt somit zum Gen-Knockdown (Elbashir et al., 2001; Sontheimer, 2005). Der spezielle Gen-Knockdown durch siRNA wird als vielversprechender Therapieansatz für menschliche Krankheiten gesehen (Ketting, 2011).

In einigen Studien wurde die Hemmung von DNA- und RNA-Viren durch spezifisch hergestellte siRNAs, z. B. des HIV-1, Hepatitis-C-Virus, Influenzavirus A, humanen Coronavirus, felines Immundefizienzvirus (FIV), felines Herpesvirus 1 (FHV-1), felines Coronavirus (FCoV), Tollwut-Virus und des murinen Leukämievirus (MuLV), untersucht (Capodici et al., 2002; Jacque et al., 2002; McCaffrey et al., 2002; Park et al., 2002; Ge et al., 2004; Tompkins et al., 2004; Li et al., 2005a; Baba et al., 2007; Wilkes und Kania, 2009; McDonagh et al., 2011; He et al., 2012; Rajput et al., 2012; Yang et al., 2012).

FeLV-A infiziert die Wirtszelle über den Oberflächenrezeptor feTHTR1 (Mendoza et al., 2006). In der Wirtszelle wird die RNA des FeLV durch die eigene Reverse Transkriptase (RT) transkribiert und in das Wirtszellgenom eingebaut. Während der Replikation werden das Hüllgen (envelope, *env*), das gruppenspezifische Antigen (*gag*) sowie die Polymerase (*pol*) aktiviert. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Vermehrung von HIV in infizierten Zellen durch spezifische siRNAs gegen das *env*-Gen gehemmt wird (Park et al., 2002; Lee et al., 2003). Auch eine siRNA komplementär zu einem Hüllgen des bovinen Virus-Diarrhoe-Virus (BVDV) unterdrückte dessen Virusvermehrung (Mishra et al., 2011). Es wird postuliert, dass Kombinationen aus mehreren siRNAs, die mehrere Gen-Abschnitte gleichzeitig angreifen, eine Virusreplikation noch effektiver hemmen könnten als einzelne siRNA (Ji et al., 2003; Ye und Jin, 2006).

Ziel der Studie war es, die antivirale Wirksamkeit von siRNAs in FeLV-A/Glasgow-1-infizierten felines

Fibroblasten (Crandell feline kidney cells, CrFK-Zellen) zu untersuchen. Dafür wurden 27- und 21-Nukleotid-lange siRNAs hergestellt, die komplementär zum FeLV-*env*-Gen und zur mRNA des FeLV-A Rezeptors (feTHTR1) waren. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit von siRNA-Kombinationen untersucht. Dafür wurden die *env*- und Rezeptor-siRNA kombiniert. Als Kontrollen wurden siRNAs komplementär zu einem Koi-Herpesvirus hergestellt, die weder an das FeLV-Gen noch an das Katzengenom binden konnten. Als weitere Kontrollen dienten Zellen, die nach Infektion unbehandelt blieben, oder mit AZT behandelt wurden.

Material und Methoden

Zellkultur

CrFK-Zellen (CCL-94, ATCC-LGC, D) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, D), 10 % Pferdeserum (HS) (PAA Laboratories GmbH, D) und 1 % 100 x Penicillin-Streptomycin (P-S, 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) (PAA Laboratories GmbH, D) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre (Heraeus® HeraCell® 150 Tri-Gas Cell Culture Incubator, Kendro Laboratory Products, D) bis zu einer Gesamtanzahl von 1,5 x 10⁶ vermehrt. Alle zwei Tage wurde das komplette Zellkulturmedium (DMEM, 10 % HS, 1 % P-S) durch Neues ersetzt.

Transfektion CrFK-Zellen mit FeLV-A/Glasgow-1-Plasmid

CrFK-Zellen wurden mithilfe des Attractene® Transfektionsreagents (Qiagen, D) mit dem FeLV-A/Glasgow-1-Plasmid (Stewart et al., 1986) transfiziert. 4 µg Plasmid wurden mit 300 µl Zellkulturmedium verdünnt und mit 15 µl Attractene® zu 10 000 µl Zellsuspension zugegeben. Die Zellen wurden anschließend zwölf Tage inkubiert.

siRNA

Es wurden siRNAs komplementär zum *env*-Gen (*env*), zur mRNA des felines Zellrezeptors feTHTR1 (*rez*) und ohne Komplementarität zu FeLV-A/Glasgow-1 oder dem Katzengenom (*khv*) hergestellt. Für jede Gruppe wurden zwei siRNAs produziert, eine aus 27 (lang, L) und eine aus 21 (kurz, S) Nukleotiden (Biomers.net GmbH, D). Die Komplementarität wurde durch BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) bestätigt. Die siRNA-Paare (sense/antisense) wurden mithilfe einer speziellen Technologie für die Herstellung und Qualitätskontrolle für siRNA (DEQOR) konstruiert (Henschel et al., 2004). Die 21-Nukleotid-langen siRNAs wurden mit Phosphorothioat- und 2'-O-methyl-Bindungen modifiziert, um die Stabilität zu erhöhen. Des Weiteren wurden lange und kurze *env*- und *rez*-siRNAs kombiniert (*env/ rez*). Die nicht-komplementären siRNAs wurden analog einer Sequenz des Koi-Herpesvirus des *Cyprinus carpio* hergestellt (Biomers.net, D). Die lange (L) siRNA war komplementär zur DNA-Polymerase (ORF 79) und die kurze (S) siRNA zur DNA-Helicase (ORF 71) des Koi-Herpesvirus (Tab. 1).

Aufbereitung der siRNA und Vorbereitung der siRNA für die Transfektion

Jede siRNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und mit HEPES-Puffer (Qiagen, D) 1:1 zu einer Primer-Konzentration von 50 µM gemischt. 30 µl sense-Primer und

TABELLE 1: siRNA-Sequenzen für die Untersuchung der Wirksamkeit auf die Vermehrung des feline Leukämievirus *in vitro*

siRNA	Sequenz (5' – 3')
FeLV-envelope (<i>env</i>)-Gen	
Short sense	GGGAUUGCAAUAGGU* ^a dT* ^a dT
Short antisense	UACCUAAGAUUGCAAUC* ^a 5'dT* ^a dT
Long sense	AACGGAUUGGGACCGAGAUAGGUAA
Long antisense	UUAACCUAUCUCCGGUCCCAUCCGUU
Wirtszellrezeptor (feTHR1)-mRNA	
Short sense	CGAAUGGCAUAGGCAC* ^a dT* ^a dT
Short antisense	UGUGCCUUGAUGCCAUU* ^a 5'dT* ^a dT
Long sense	AAGAGCCUGUUCUACACAGGUCCU
Long antisense	AGGAACGUGGUGAAGAAGAGGCUUU
Nicht-komplementär (Koi-Herpesvirus)	
Short sense ^a	GUGUGUGAGGUCAAGCUAG* ^a dT* ^a dT
Short antisense ^a	UCUAGCUUGAACCUCACAC* ^a 5'dT* ^a dT
Long sense ^a	GCGAGUGUGUUGUCUUAACUAdTdT
Long antisense ^b	UAGUUGAAGACAAACAGCAGCUGCdTdT

* Phosphorothioat-Bindungen

5 2'-O-methyl-modifiziertes Nukleotid C, 6 2'-O-methyl-modifiziertes Nukleotid G

7 2'-O-methyl-modifiziertes Nukleotid A

dT = Desoxythymidin

^a siRNA bindet an die DNA-Helikase (ORF 71) des Koi-Herpesvirus^b siRNA bindet an die DNA-Polymerase (ORF 79) des Koi-Herpesvirus

30 µl antisense-Primer wurden mit 15 µl HEPES Puffer zu einer Primer-Konzentration von 20 µM gemischt. Die Lösungen wurden für eine Minute bei 90 °C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

An Tag 13 wurden FeLV-A/Glasgow-1-infizierte CrFK-Zellen mit den siRNA behandelt. Die infizierten CrFK-Zellen wurden von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst (trypsiniert). Jeweils 0,5 x 10⁵ Zellen pro Zellkultur-Probentiefung wurden in eine Zellkulturplatte mit 24 Probentiefungen (TPP® cell culture test plate, CH) gegeben. Für jede Probentiefung mit 0,5 x 10⁵ Zellen wurden insgesamt 500 µl Zellkulturmedium, bestehend aus DMEM, 10 % HS und 1 % P-S, zugegeben.

Transfektion der siRNAs

An Tag 13 wurden die aufbereiteten siRNAs mit dem HiPerFect® Transfektionsreagens (Qiagen, D, „Fast-Forward Transfection of Adherent Cells with siRNA/miRNA in 24-Well Plates“) den FeLV-A/Glasgow-1-infizierten CrFK-Zellen zugegeben. Pro Probentiefung wurden 1,5 µl der jeweils hergestellten siRNA und 3 µl HiPerFect® mit 95,5 µl DMEM vermischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben. Alle siRNA-Ansätze wurden in drei Replikaten durchgeführt.

Unbehandelte und mit AZT behandelte Kontrolle

Als Kontrollen zu den Ansätzen mit siRNAs wurden an Tag 13 FeLV-A/Glasgow-1-infizierte CrFK-Zellen entweder mit HiPerFect® (Qiagen, D) ohne siRNAs (unbehandelte Kontrolle) oder mit 5 µg/ml (90 % hemmende Konzentration, IC₉₀) AZT (Retrovir®, GlaxoSmithKline, D) behandelt. Auch die Kontrollen wurden in drei Replikaten durchgeführt.

Probenentnahme

An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden alle 24 Stunden aus jeder Probentiefung 300 µl Zellkulturüberstand abgenommen und mit 300 µl neuem kompletten Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Proben wurden bei –20 °C gelagert.

Quantitative real-time RT-PCR

Die virale RNA wurde mit einem MagNA Pure® LC Total Nucleic Acid TNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, CH) aus den Zellkulturüberständen extrahiert. Dafür wurden 200 µl Probe mit 300 µl Lysepuffer versetzt (Guanidinium Thiocyanat und Triton X 100, Roche Diagnostics, CH) und in die Probentiefungen des MagNA Pure LC® Instrument (Roche Diagnostics, CH) gegeben. Für jede Probe wurde eine Negativkontrolle mit MgCl₂ und CaCl₂ PBS durchgeführt (Invitrogen, CH). Die absolute Menge viraler RNA jeder Probe wurde durch quantitative real-time RT-PCR amplifiziert und mithilfe des ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, CH) ausgewertet (Cattori und Hofmann-Lehmann, 2008).

ELISA

Der freie Antigengehalt p27 wurde mit dem Feline Leukemia Virus-p27 Antigen ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, D) quantifiziert. Dafür wurden zunächst 50 µl ELISA-Puffer zu den 96 Probentiefungen einer Testplatte hinzugegeben. Anschließend wurden die Positiv- und Negativkontrolle des ELISA-Kits und 50 µl der jeweiligen Probe zu den einzelnen Probentiefungen gegeben und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Diese Ansätze wurden in zwei Replikaten durchgeführt. Danach wurde die Testplatte manuell mit einer Waschlösung mit TBS-T gewaschen. Nach der Waschung wurden 100 µl anti-FeLV-p27-HRP-Konjugat zu den einzelnen Probentiefungen gegeben und wieder 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem manuellen Waschen wurden 100 µl Substrat-Lösung zu jeder Probentiefung gegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 15 µl einer Stop-Lösung (H₂SO₄) gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm mithilfe eines BioTek Readers gemessen (The Synergy™ HT, BioTek, D).

Statistische Auswertung

Es wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen (ANOVA) und ein sich daran anschließender Tukey's-Test durchgeführt (GraphPad Software, Inc., USA). Der signifikante Schwellenwert betrug p < 0,05.

Ergebnisse

Quantifizierung viraler RNA in Zellkulturüberständen mit quantitativer real-time RT-PCR

Der Gehalt viraler RNA in den Zellkulturüberständen FeLV-A/Glasgow-1-infizierter CrFK-Zellen wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR im Abstand von 24 Stunden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt (Abb. 1 A–D).

In den Zellkulturüberständen der Zellen, die mit AZT behandelt oder unbehandelt blieben, stieg kontinuierlich der Gehalt viraler RNA. Es war also keine Hemmung der Virusvermehrung zu erkennen.

Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und zu den Zellen, die mit AZT behandelt wurden, waren in den Zellkulturüberständen der Zellen, die mit envL-siRNA oder envS-siRNA behandelt wurden, bereits nach 48 Stunden signifikant weniger virale RNA nachweisbar (96 % und 87 %). Während der nächsten drei Tage stieg der Gehalt viraler RNA zwar an, aber die Werte waren nach wie vor signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 1 A).

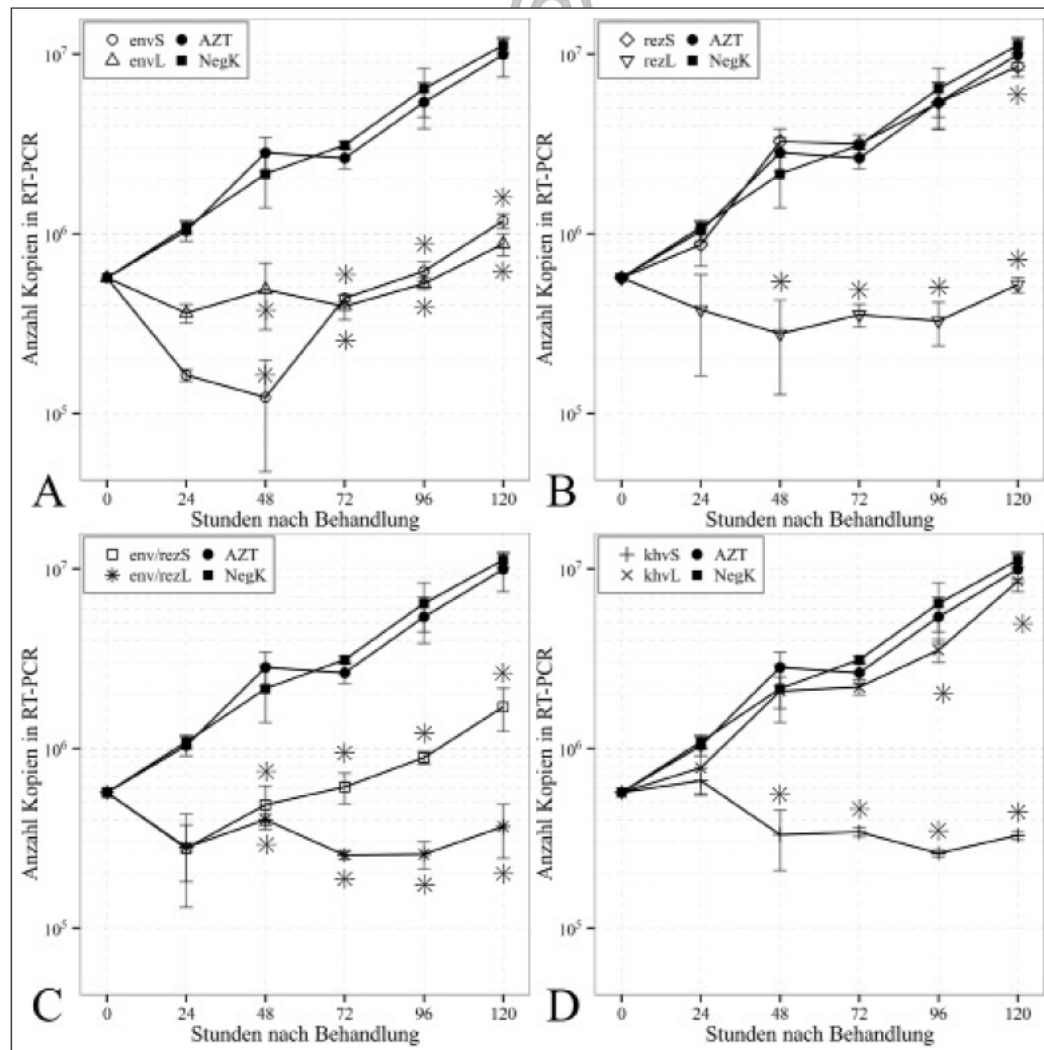


ABBILDUNG 1A-D: Einfluss von langen (L, 27 Nukleotide) und kurzen (S, 21 Nukleotide) siRNAs auf die FeLV-Virusvermehrung in FeLV-A/Glasgow-1-infizierten CrFK-Zellen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Es wurden siRNAs, die komplementär zum FeLV-env-Gen (envL und envS), zur mRNA des feline Zellrezeptors (feTHTR1) (rezL und rezS), siRNA-Kombinationen aus env und rez (env/rezL und env/rezS) und nicht-komplementäre siRNAs, die nicht an das FeLV- oder Katzen genom binden (khvL und khvS), untersucht. Aus den Zellkulturüberständen der FeLV-A/Glasgow-1-infizierten CrFK-Zellen wurde der virale RNA (vRNA)-Gehalt mittels quantitativer real-time RT-PCR bestimmt. Die Konzentration viraler RNA wurde alle 24 Stunden zwischen den siRNA-behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle (NegK, ohne siRNA oder AZT) sowie mit den mit AZT behandelten Zellen, verglichen (* signifikanter Unterschied zu den Kontrollen AZT und unbehandelten Kontrolle [$p < 0,05$]).

Auch in den Zellkulturüberständen der Zellen, die mit rezL-siRNA behandelt wurden, war eine Hemmung der Virusvermehrung bereits nach 48 Stunden (90 %) nachweisbar und nach 120 Stunden immer noch 16 Mal stärker als die von rezS-siRNA (Abb. 1 B).

Die siRNA-Kombinationen env/rezL und env/rezS verursachten im Vergleich zu den Kontrollen nach 48 Stunden eine signifikante Unterdrückung der Virusvermehrung (86 % und 83 %). Dabei war der Hemmeffekt zwischen env/rezL-siRNA und zwischen envL-siRNA

sowie env/rezS-siRNA und rezS-siRNA jedoch nicht signifikant (Abb. 1 C).

Der Gehalt viraler RNA in den Zellkulturüberständen der khvL-siRNA-behandelten Zellen war nach 96 Stunden um 45 % signifikant geringer als der Gehalt viraler RNA in den Zellkulturüberständen der Kontrollen. Der Gehalt viraler RNA in den Zellkulturüberständen der khvS-siRNA-behandelten Zellen war nach 48 Stunden um 88 % signifikant geringer als bei den Kontrollen (Abb. 1 D).

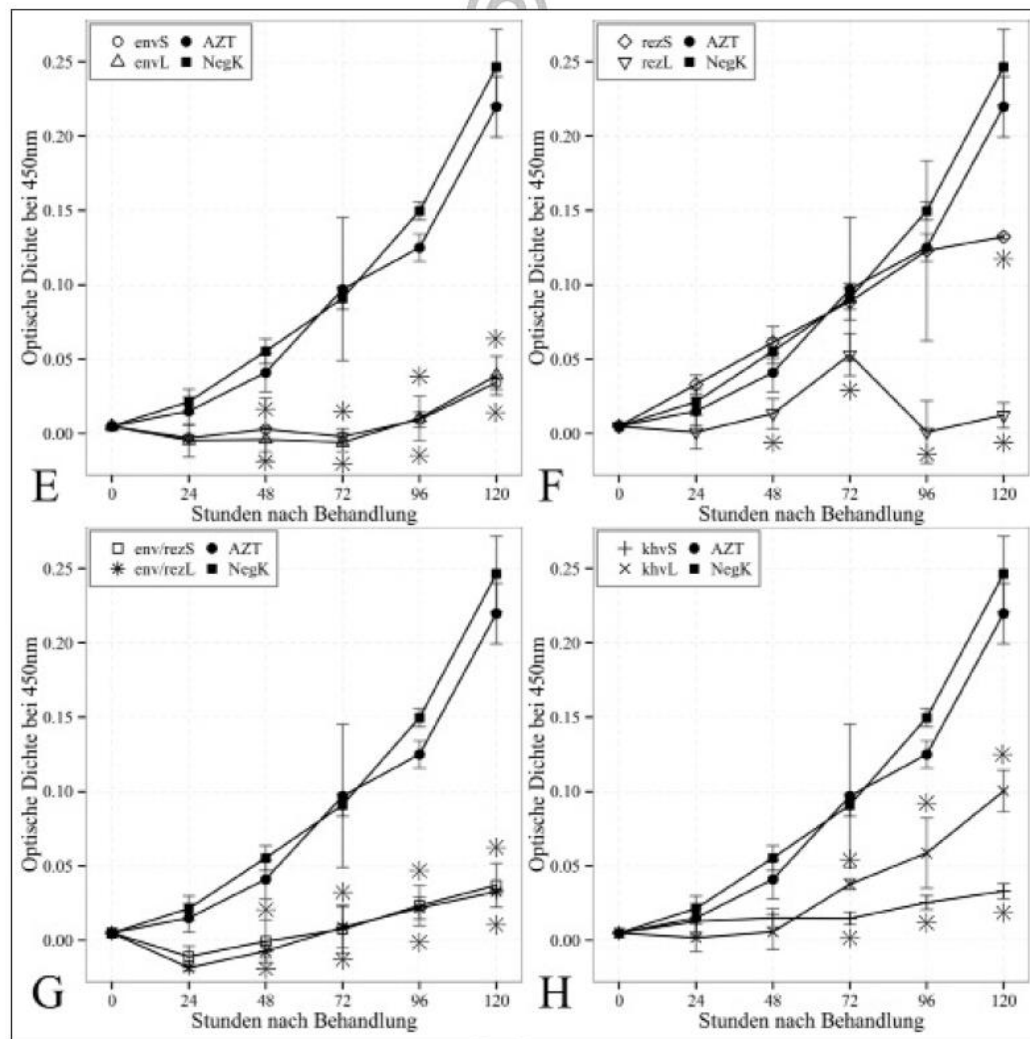


ABBILDUNG 1E-H: Einfluss von langen (L, 27 Nukleotide) und kurzen (S, 21 Nukleotide) siRNAs auf die FeLV-Virusvermehrung in FeLV-A/Glasgow-1-infizierten CrFK-Zellen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Es wurden zum FeLV-env-Gen (*envL* und *envS*), zur mRNA des feline Zellrezeptors (*feTHTR1*) (*rezL* und *rezS*) und Kombinationen aus *env* und *rez* (*env/rezL* und *env/rezS*) komplementäre siRNAs, oder nicht-komplementäre siRNAs, die nicht an das FeLV- oder Katzen genom binden (*khvL* und *khvS*), untersucht. Aus den Zellkulturüberständen der FeLV-A/Glasgow-1-infizierten CrFK-Zellen wurde das freie Antigen p27 mittels ELISA bestimmt. Die Konzentration des freien Antigens p27 wurde alle 24 Stunden zwischen den siRNA-behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle (NegK, ohne siRNA oder AZT) sowie mit den mit AZT behandelten Zellen, verglichen (* signifikanter Unterschied zu den Kontrollen AZT und unbehandelten Kontrolle [$p < 0,05$]).

Quantifizierung des freien p27-Antigens in Zellkulturüberständen mit ELISA

Die Konzentration des p27-Antigens in den Zellkulturüberständen FeLV-infizierter CrFK-Zellen wurde quantitativ mittels ELISA im Abstand von 24 Stunden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt.

Im Verlauf stieg der p27-Gehalt der unbehandelten Kontrolle sowie der Zellen, die mit AZT behandelt wurden, exponentiell an. In den Zellkulturüberständen der Zellen, die mit siRNAs behandelt wurden, waren signifikant niedrigere p27-Konzentrationen nachweisbar. Die

Resultate waren, wie nachfolgend beschrieben, ähnlich zu denen der viralen RNA-Messung.

Die Zellkulturüberstände der Zellen, die mit *envL*-, *envS*-, *rezL*-, *env/rezL*-, *env/rezS*-, *khvS*-siRNA behandelt wurden, hatten eine 90 % niedrigere p27-Konzentration als der unbehandelten und der mit AZT behandelten Kontrolle. Dieser Effekt trat bereits nach 48 Stunden auf und hielt bis zum Ende des Experiments an (Abb. 1 E, F, G, H).

Nach 120 Stunden war der Antigengehalt in Zellkulturüberständen der Zellen, die mit *rezS*-siRNA behan-

delt wurden, um 40 % geringer als in den Kontrollen (Abb. 1 F).

Der Antigengehalt in den Zellkulturüberständen der khvL-siRNA-behandelten Zellen war nach 72 Stunden um 60 % geringer als in denen der Kontrollen (Abb. 1 H).

Diskussion

In dieser Studie wurde die Wirksamkeit von siRNAs gegen eine FeLV-A/Glasgow-1-Vermehrung *in vitro* untersucht. Alle siRNAs unterdrückten die Virusreplikation in der Zellkultur. Dies zeigte sich in einer im Vergleich zu den unbehandelten Zellen geringeren Konzentration viraler RNA und p27-Antigen in den Zellkulturüberständen.

Wie in vorausgegangenen Studien mit HIV-1 und FIV war nach 48 Stunden das stärkste Hemmpotenzial nachzuweisen. Danach nahm der Effekt der siRNA in der vorliegenden wie auch in den früheren Studien kontinuierlich ab (Baba et al., 2007).

Die Wirksamkeit von siRNAs gegen Hüllgene wurde schon mehrfach bei anderen Viren untersucht. So konnte gezeigt werden, dass dem *env*-Gen des HIV-1 oder dem Hüllgen des BVDV komplementäre siRNA erfolgreich die Virusvermehrung unterdrücken (Park et al., 2002; Mishra et al., 2011). Ebenso konnten spezifische, gegen das FHV-1-Hüllprotein gerichtete siRNAs effektiv eine FHV-1-Vermehrung hemmen (Wilkes und Kania, 2009). Auch in der hier vorliegenden Studie waren lange und kurze *env*-siRNA in der Lage, die FeLV-Vermehrung zu hemmen.

Ein anderer Ansatzpunkt ist die Hemmung der RNA der Rezeptoren auf der Wirtszelle, die Viren für den Eintritt benutzen. Dieser Ansatz wurde *in vitro* gegen HIV-1 erfolgreich eingesetzt (Lee et al., 2003). Auch in der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Virusreplikation durch siRNAs gegen die mRNA des feTHTR1-Rezeptors unterdrückt werden kann. Allerdings war die Wirksamkeit der langen siRNA deutlich besser als die der kurzen. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Nukleotid-Länge zurückzuführen. Während in manchen Studien kein Unterschied bei Verwendung unterschiedlich langer siRNA beobachtet werden konnte, zeigte sich in anderen ein deutlicher inhibitorischer Effekt durch lange (27 Nukleotide) siRNAs (Wilkes und Kania, 2009). In einer *In-vitro*-Studie wurde gezeigt, dass 27-Nukleotid-lange siRNA eine stärkere und längeranhaltende Wirkung hatten als 21-Nukleotid-lange siRNA (Kim et al., 2005). Ein weiterer Grund für die Unterschiede in der Wirksamkeit der langen und kurzen Rezeptor-siRNA könnte die Modifikation der kurzen siRNA (Phosphorothioat- und 2'-O-methyl-Bindungen) sein. Durch Interaktionen mit der mRNA des feTHTR1-Rezeptors könnten diese eine Bindung sogar behindert haben. Allerdings wurde dieses Phänomen nicht bei der *env*-siRNA beobachtet. Das könnte aber auf die unterschiedlichen Zielgene zurückzuführen sein (Kim et al., 2005). Um den Effekt der Hemmung der mRNA des zellulären Rezeptors feTHTR1 mit siRNA genauer zu untersuchen, könnten in einer Folgestudie ein Immunoblot oder eine quantitative real time RT-PCR zum Nachweis der mRNA des Rezeptors durchgeführt werden.

Die Wirksamkeit von siRNA-Kombinationen wird kontrovers diskutiert. In manchen Studien konnten

siRNA-Kombinationen, die gegen unterschiedliche spezifische Zielgene gerichtet waren, bessere Ergebnisse erzielen (Ji et al., 2003; Liang et al., 2005; Ye und Jin, 2006). In anderen Studien, unter anderem mit HIV-1, war dagegen kein Vorteil durch siRNA-Kombinationen zu beobachten (Lee et al., 2003). In der vorliegenden Studie war die antivirale Wirksamkeit durch siRNA-Kombinationen nicht besser als die der einzelnen siRNAs. Dennoch könnten siRNA-Kombinationen Resistenzentwicklungen der Viren gegen siRNAs verhindern (Wilson und Richardson, 2005; Wu et al., 2005).

Interessanterweise unterdrückten auch die nicht-komplementären siRNAs die FeLV-Vermehrung. Dies lässt den Verdacht aufkommen, dass möglicherweise nicht nur komplementäre siRNAs eine Virusvermehrung unterdrücken, sondern auch nicht-komplementäre siRNAs auf einer anderen Stufe mit dem FeLV-Replikationszyklus interferieren können. Weiterhin wäre denkbar, dass nicht-komplementäre siRNAs mit anderen Regionen des feline Gens interferieren, die für die Replikation des Virus gebraucht werden. Ferner könnten nicht-komplementäre siRNAs durch eine unspezifische Stimulierung des Immunsystems eine Virusvermehrung unterdrücken (Jacque et al., 2002; Judge et al., 2005; Sioud, 2005). In einer *In-vivo*-Studie mit Mäusen wurde z. B. eine Besserung einer herpesinduzierten stromalen Keratitis durch Behandlung mit unspezifischen Oligonukleotiden beobachtet (Wasmuth et al., 2008). Es wird angenommen, dass siRNAs die Immunabwehr in der Zelle nicht direkt aktivieren, sondern durch die Bindung an sogenannte Toll-like-Rezeptoren unspezifisch eine Zytokinproduktion anregen (Elbashir et al., 2001; Jacque et al., 2002; Sioud, 2005). In einer anderen *In-vivo*-Studie mit Mäusen wurde beispielsweise die Entwicklung von Antikörpern gegen das Hepatitis-B-Virus durch eine siRNA-Therapie angeregt (Ren et al., 2013). Des Weiteren kommt es zu sogenannten „off-target“-Effekten, wenn z. B. andere Gene als das komplementäre Zielgen Sequenzübereinstimmungen mit den spezifischen siRNAs haben (Jackson et al., 2006). Die Wirkung von siRNAs ist von der Verfügbarkeit der Zielsequenz, der Stabilität der siRNA und der mRNA-Struktur abhängig (Chen und Zhang, 2012). Kürzlich wurde eine thermodynamische Genom-Analyse („PICKY“) entwickelt, die mögliche unspezifische und ungezielte Interferenzen identifizierte (Chen et al., 2013). Über dieses System war es möglich, die „off-target“-Gene zu identifizieren, die sich zu einer siRNA entwickeln und eine Interferenz auslösen können. Weitere Interferenzen können durch eine unspezifische Interferenz durch den siRNA-Begleitstrang auftreten. In der Zelle wird die doppelsträngige siRNA in den Begleitstrang und den Leitstrang gespalten. Der Leitstrang der siRNA bindet im Enzymkomplex RISC an die Zielsequenz. Kürzlich wurde die Modifikation des Begleitstranges mit 5-Nitroindol am 15'-Ende in HEK-293-Zellen untersucht. Durch diese Modifikation wurden „off-target“-Effekte durch den Begleitstrang erheblich unterdrückt und die Wirkung des Leitstranges verbessert (Zhang et al., 2012). So wurde in Huh7-Zellen und in Mäusen gezeigt, dass 2'-O-guadinopropyl-modifizierte siRNA weniger Nebeneffekte hatten (Marimani et al., 2013). Die nicht-komplementären siRNAs könnten auch einen spezifischen Effekt auf die virale reverse Transkriptase haben. Als Polyanion können siRNAs mit dem Template konkurrieren und eine Hemmung der RT verursachen. Modifizierte

Phosphorothioat- oder 2'-O-methyl-Bindungen und nicht-modifizierte Oligonukleotide waren in der Lage, sequenzunabhängig eine reverse Transkription des aviären Myeloblastosis-Virus (AMV) und des HIV zu inhibieren, indem sie an die RT banden (Hatta et al., 1993). In chronisch infizierten HIV-1-T-Zellen hemmten zu dem rev-Gen komplementäre Phosphorothioat-Oligomere signifikant die Produktion verschiedener viraler Proteine und viraler mRNA-Transkripte (Matsukura et al., 1989).

Des Weiteren ist auch der Einfluss eventueller zytotoxischer Effekte durch siRNAs komplementär zu den Zellrezeptoren nicht ausgeschlossen. Dennoch wurde in einer HIV-1-Studie gezeigt, dass durch siRNAs, die gegen einen spezifischen Zellfaktor gerichtet waren, keine zytotoxischen Nebeneffekte auftraten (Li et al., 2005b).

Die als Kontrolle in dieser Studie verwendete Dosis von 5 µg/ml AZT konnte im Gegensatz zu früheren Studien die FeLV-Replikation in vitro nicht hemmen (Tavares et al., 1987; Hoover et al., 1990). Im Unterschied zu anderen Studien waren die CrFK-Zellen in dieser Studie bereits zwölf Tage mit dem FeLV infiziert. AZT wurde nicht, wie in den anderen Studien, schon vor der Infektion mit dem FeLV den Zellen zugegeben. Dies bedeutet, dass AZT wohl nur dann ein wirksames Medikament ist, solange die Zellen noch nicht mit FeLV infiziert sind. Ein anderer Grund für den fehlenden Einfluss von AZT auf die Virusvermehrung könnte sein, dass AZT nur einmalig am ersten Tag zu den Zellen gegeben wurde. In vorausgegangenen Studien wurde AZT dagegen täglich zu den Zellen gegeben (Hoover et al., 1990). Dies war in der vorliegenden Studie nicht möglich, da die siRNAs auch einmalig zugegeben wurden und sonst die Wirkung nicht mit AZT zu vergleichen gewesen wäre. Eine Resistenzentwicklung des FeLV gegenüber AZT wäre eine weitere mögliche Erklärung und kann nicht ausgeschlossen werden, da dies in einer Studie mit FIV beobachtet wurde (Remington et al., 1991).

In einer Studie wurde die Hemmung von small hairpin RNAs (shRNAs) auf die FeLV-A/Rickard-Virusvermehrung in vitro untersucht (Ornelas et al., 2012). Bei zwei von drei untersuchten shRNA-Molekülen, die gegen das gag-Gen des FeLV gerichtet waren, konnte nach 48 Stunden mittels Western-Blot-Densitometrie eine Verringerung des p27-Antigens um etwa 50 % festgestellt werden. Die Untersuchung der RT-Aktivität zeigte einen Hemmeffekt in einer ähnlichen Größenordnung. Neben dem env-Gen und dem Wirtszellrezeptor FeTfR1, die in unserer Studie untersucht wurden, scheint das gag-Gen ebenfalls ein geeignetes Ziel für siRNAs zu sein, wobei jedoch keine Ergebnisse zum Gehalt der viralen RNA dargestellt wurden. Die Sequenzidentität zwischen FeLV-A/Rickard- und dem in unserer Studie verwendeten FeLV-A/Glasgow-1-Subtyp wird auf etwa 76–78 % geschätzt, was zu unterschiedlichen Hemmpotenzialen der siRNAs beitragen könnte (Rosenberg et al., 1980).

In vielen Studien wurde bereits die Schwierigkeit diskutiert, siRNAs in vivo therapeutisch anzuwenden. Ein grundlegendes Problem ist, dass die synthetisch hergestellten siRNAs durch entstehende Virus-Mutationen im Feld nicht in der Lage wären, eine spezifische Bindung mit dem mutierten komplementären Strang einzugehen. Auch die Entstehung von Resistenzen würde eine effektive Wirkung von siRNAs behindern. Dieses Phänomen wird insbesondere bei RNA-Viren beobachtet, da durch

deren virale Polymerase häufig Mutationen entstehen, die eine komplementäre Bindung einer siRNA zu der ursprünglichen Zielsequenz verhindern. Um dies zu umgehen, könnten verschiedene siRNAs miteinander kombiniert werden, die verschiedene Zielgene angreifen (Boden et al., 2003; Das et al., 2004). Auch wenn sich der Effekt durch die Gabe mehrerer siRNAs nicht erhöhen würde, kann so zumindest die Entwicklung einer Resistenz des Virus gegenüber siRNAs vermindert werden (Wilson und Richardson, 2005; Wu et al., 2005).

Ferner ist es schwierig einen Transportmechanismus zu finden, der die siRNA an ein bestimmtes Organ oder Gewebe bringen würde, ohne dass die siRNA vorher vom Körper abgebaut werden könnte. Dabei könnte der Einsatz von nicht-viralen oder viralen Vektoren nützlich sein. Aufgrund unspezifischer Nebenwirkungen wäre zwar die Verwendung von nicht-viralen Transportmechanismen zu bevorzugen, jedoch ist die Effektivität viraler Transportmechanismen besser, wie in einigen In-vitro- und In-vivo-Studien gezeigt werden konnte (Kronke et al., 2004; Harper et al., 2006; An et al., 2007; Baba et al., 2008). Typischerweise werden für nicht-virale Transportmechanismen Ansätze mit Kationen benutzt, aber auch monoklonale Antikörper und Peptide verwendet (Hughes und Rao, 2005; Vohries und Nemunaitis, 2007). Durch die positive Ladung können Kationen aber auch toxische Nebenwirkungen verursachen (Zhang et al., 2007; Kim et al., 2009). Des Weiteren gibt es Studien, in denen der Einsatz von auf lipid-basierenden Nanopartikeln, Polyethylamin und synthetischen RNA-Molekülen („aptamers“) erforscht wurde (Ge et al., 2004; Moreira et al., 2008; Dove, 2010). Ebenso verbessert eine Modifizierung der siRNA mit Phosphorothioat- und 2'-O-methyl-Gruppen die Stabilität im Serum und Wirkung, was z. B. in der vorliegenden Studie bei den kurzen siRNA angewendet wurde (Braasch et al., 2003).

Die Hemmung der Virusvermehrung durch siRNAs in vitro ist nur bedingt mit den Verhältnissen in vivo zu vergleichen. Es ist schwierig eine geeignete siRNA-Dosierung und Transfermethode für siRNAs zum Ort der Virusvermehrung zu finden und zu entwickeln. In mehreren Studien wurde der Einsatz von viralen und nicht-viralen Vektoren untersucht, um am Zielort eine stabile Expression der siRNAs zu erreichen und das Hemmpotenzial zu verstärken (Tompkins et al., 2004; An et al., 2007). Für eine therapeutische Anwendung in FeLV-infizierten Katzen könnte auch der Infektionszeitpunkt für eine Therapie mit siRNAs ausschlaggebend sein. Um dies zu untersuchen, sollte zunächst die Wirksamkeit von siRNAs bei akut und chronisch FeLV-infizierten Zellen erforscht werden.

Eine Limitation der Studie ist, dass nicht eindeutig nachgewiesen werden kann, wodurch die Hemmung der FeLV-Vermehrung tatsächlich verursacht wurde, da sowohl die komplementären als auch die nicht-komplementären siRNAs eine Virusvermehrung unterdrückten. In einer Folgestudie könnte die Zytokin-Produktion gemessen werden, um zu sehen, ob eine Stimulierung des Immunsystems durch siRNA eine Rolle bei der Hemmung der Virusvermehrung spielt.

Zusammenfassend konnte die FeLV-Vermehrung in der vorliegenden Studie erfolgreich durch siRNAs gehemmt werden. Da bis heute nach geeigneten Medikamenten für die Therapie FeLV-infizierter Katzen gesucht wird, könnte der Einsatz von siRNAs gegen eine FeLV-Vermehrung eine interessante Option sein.

Allerdings sind weitere Studien zur Klärung des Wirkmechanismus sowie zur Umsetzung einer Anwendung in vivo nötig.

Danksagung

Wir danken B. Weibel für ihre exzellente Unterstützung bei der quantitativen real-time RT-PCR, die im veterinärmedizinischen Labor der Universität Zürich, CH, durchgeführt wurde.

Conflict of interest: Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflusst haben könnten.

Literatur

- An DS, Donahue RE, Kamata M, Poon B, Metzger M, Mao SH, Bonifacio A, Krouse AE, Darlix JL, Baltimore D, Qin FX, Chen IS (2007): Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13110–13115.
- Baba K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H (2008): Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines. *J Vet Med Sci* 70: 777–783.
- Baba K, Mizukoshi F, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H (2007): Application of RNA interference for inhibiting the replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cell lines. *Vet Microbiol* 120: 207–216.
- Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B (2003): Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 77: 11531–11535.
- Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA, Corey DR (2003): RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42: 7967–7975.
- Capodici J, Kariko K, Weissman D (2002): Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 169: 5196–5201.
- Cattori V, Hofmann-Lehmann R (2008): Absolute quantitation of feline leukemia virus proviral DNA and viral RNA loads by TaqMan real-time PCR and RT-PCR. *Methods Mol Biol* 429: 73–87.
- Chen J, Zhang W (2012): Kinetic analysis of the effects of target structure on siRNA efficiency. *J Chem Phys* 137: 225102.
- Chen X, Liu P, Chou HH (2013): Whole-genome thermodynamic analysis reduces siRNA off-target effects. *PLoS one* 8: e58326.
- Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R, Berkhout B (2004): Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 78: 2601–2605.
- Dove A (2010): An apt approach. *Nat med* 16: 258–260.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschli T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498.
- Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J (2004): Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8676–8681.
- Harper SQ, Staber PD, Beck CR, Fineberg SK, Stein C, Ochoa D, Davidson BL (2006): Optimization of feline immunodeficiency virus vectors for RNA interference. *J Virol* 80: 9371–9380.
- Hartmann K, Donath A, Beer B, Egberink HF, Horzinek MC, Lutz H, Hoffmann-Fezer G, Thum I, Thefeld S (1992): Use of two virustatica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet Immunol and Immunopathol* 35: 167–175.
- Hatta T, Kim SG, Nakashima H, Yamamoto N, Sakamoto K, Yokoyama S, Takaku H (1993): Mechanisms of the inhibition of reverse transcription by unmodified and modified antisense oligonucleotides. *FEBS Lett* 330: 161–164.
- He Y, Cao W, Pan S, Zhong F, Zhang M (2012): Inhibition of canine parvovirus replication in cultured cells by small interfering RNAs expressed from plasmid vectors. *Antiviral Res* 95: 237–241.
- Henschel A, Buchholz F, Habermann B (2004): DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Res* 32: W113–120.
- Hoover EA, Zeidner NS, Mullins JI (1990): Therapy of presymptomatic FeLV-induced immunodeficiency syndrome with AZT in combination with alpha interferon. *Ann N Y Acad Sci* 616: 258–269.
- Hughes JA, Rao GA (2005): Targeted polymers for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2: 145–157.
- Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorovova A, Linsley PS (2006): Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA* 12: 1197–1205.
- Jacque JM, Triques K, Stevenson M (2002): Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418: 435–438.
- Ji J, Wernli M, Klimkait T, Erb P (2003): Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett* 552: 247–252.
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I (2005): Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23: 457–462.
- Ketting RF (2011): The many faces of RNAi. *Dev Cell* 20: 148–161.
- Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ (2005): Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnol* 23: 222–226.
- Kim Y, Tewari M, Pajewski JD, Cai S, Sen S, Williams JH, Sirsi SR, Lutz GJ, Discher DE (2009): Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *J Controlled Release* 134: 132–140.
- Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M (2004): Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 78: 3436–3446.
- Lee MT, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR (2003): Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol* 77: 11964–11972.
- Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, Xu J, Liu Y, Zheng BJ, Woodle MC, Zhong N, Lu PY (2005a): Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 11: 944–951.

- Li Z, Xiong Y, Peng Y, Pan J, Chen Y, Wu X, Hussain S, Tien P, Guo D (2005b): Specific inhibition of HIV-1 replication by short hairpin RNAs targeting human cyclin T1 without inducing apoptosis. *FEBS Lett* 579: 3100–3106.
- Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H (2005): Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65: 967–971.
- Marimani MD, Ely A, Buff MC, Bernhardt S, Engels JW, Arbutnot P (2013): Inhibition of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo using 2'-O-guanidinopropyl modified siRNAs. *Bioorg Med Chem* 21: 6145–6155.
- Matsukura M, Zon G, Shinozuka K, Robert-Guroff M, Shimada T, Stein CA, Mitsuya H, Wong-Staal F, Cohen JS, Broder S (1989): Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus in vitro by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against rev (art/trs) in chronically infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4244–4248.
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA (2002): RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38–39.
- McDonagh P, Sheehy PA, Norris JM (2011): In vitro inhibition of feline coronavirus replication by small interfering RNAs. *Vet Microbiol* 150: 220–229.
- Mendoza R, Anderson MM, Overbaugh J (2006): A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J Virol* 80: 3378–3385.
- Mishra N, Rajukumar K, Kalaiyarasu S, Behera SP, Nema RK, Dubey SC (2011): Small interfering RNAs targeting viral structural envelope protein genes and the 5'-UTR inhibit replication of bovine viral diarrhoea virus in MDBK cells. *Acta Virol* 55: 279–282.
- Moreira JN, Santos A, Moura V, Pedrosa de Lima MC, Simoes S (2008): Non-viral lipid-based nanoparticles for targeted cancer systemic gene silencing. *J Nanosci Nanotechnol* 8: 2187–2204.
- Ornelas SS, Barra GB, Kanzaki LIB (2012): Inhibition of Feline Leukemia Virus Replication in Chronically Infected Cell Line Utilizing RNA Interference. *Retrovirology* (Auckl) 4: 13–20.
- Park WS, Miyano-Kurosaki N, Hayafune M, Nakajima E, Matsuzaki T, Shimada E, Takaku H (2002): Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 30: 4830–4835.
- Rajput R, Khanna M, Kumar P, Kumar B, Sharma S, Gupta N, Saxena L (2012): Small interfering RNA targeting the nonstructural gene 1 transcript inhibits influenza A virus replication in experimental mice. *Nucleic Acid Ther* 22: 414–422.
- Remington KM, Chesebro B, Wehrly K, Pedersen NC, North TW (1991): Mutants of feline immunodeficiency virus resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J Virol* 65: 308–312.
- Ren GL, Huang GY, Zheng H, Fang Y, Ma HH, Xu MC, Zhang HB, Zhang WY, Zhao YG, Sun DY, Hu WK, Liu J (2013): Changes in innate and permissive immune responses after HBV transgenic mouse vaccination and long-term-siRNA treatment. *PloS one* 8: e57525.
- Rosenberg ZE, Pedersen FS, Haseltine WA (1980): Comparative analysis of the genomes of feline leukemia viruses. *J Virol* 35: 542–546.
- Sloud M (2005): Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 348: 1079–1090.
- Sontheimer EJ (2005): Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 127–138.
- Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JL, Onions DE, Neil JC (1986): Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J Virol* 58: 825–834.
- Tavares L, Roneker C, Johnston K, Lehrman SN, de Noronha F (1987): 3'-Azido-3'-deoxythymidine in feline leukemia virus-infected cats: a model for therapy and prophylaxis of AIDS. *Cancer Res* 47: 3190–3194.
- Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL (2004): Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8682–8686.
- Vorhies JS, Nemunaitis J (2007): Nonviral delivery vehicles for use in short hairpin RNA-based cancer therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* 7: 373–382.
- Wasmuth S, Bauer D, Steuhl KP, Heiligenhaus A (2008): Topical antisense-oligonucleotides targeting IFN-gamma mRNA improve incidence and severity of herpetic stromal keratitis by cytokine specific and sequence unspecific effects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246: 443–451.
- Wilkes RP, Kania SA (2009): Use of interfering RNAs targeted against feline herpesvirus 1 glycoprotein D for inhibition of feline herpesvirus 1 infection of feline kidney cells. *Am J Vet Res* 70: 1018–1025.
- Wilson JA, Richardson CD (2005): Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* 79: 7050–7058.
- Wu CJ, Huang HW, Liu CY, Hong CF, Chan YL (2005): Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res* 65: 45–48.
- Yang YJ, Zhao PS, Zhang T, Wang HL, Liang HR, Zhao LL, Wu HX, Wang TC, Yang ST, Xia XZ (2012): Small interfering RNAs targeting the rabies virus nucleoprotein gene. *Virus Res* 169: 169–174.
- Ye K, Jin S (2006): Potent and specific inhibition of retrovirus production by coexpression of multiple siRNAs directed against different regions of viral genomes. *Biotechnol Prog* 22: 45–52.
- Zhang J, Zheng J, Lu C, Du Q, Liang Z, Xi Z (2012): Modification of the siRNA passenger strand by 5-nitroindole dramatically reduces its off-target effects. *Chembiochem* 13: 1940–1945.
- Zhang S, Zhao B, Jiang H, Wang B, Ma B (2007): Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release* 123: 1–10.

Korrespondenzadresse:

Medizinische Kleintierklinik LMU München
 Melanie Lehmann
 c/o Vorstandsassistenz
 Veterinärstr. 13
 80539 München
 m.lehmann@medizinische-kleintierklinik.de

IV. DISKUSSION

Bis heute gibt es keine wirksame Therapie für FeLV-infizierte Katzen. Die aus der Humanmedizin stammenden antiviralen Medikamente können aufgrund ihrer Toxizität nur sehr eingeschränkt für die Behandlung FeLV-infizierter Katzen eingesetzt werden (HARTMANN, 2012). Ein neuer antiviraler Ansatz könnten kurze RNA-Moleküle, siRNAs, darstellen, die direkt mit dem viralen Vermehrungszyklus interferieren und spezifisch eine Virusreplikation unterdrücken (MA et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurde die Wirksamkeit von siRNAs gegen eine FeLV-A/Glasgow-1-Vermehrung in CrFK-Zellen untersucht. Die FeLV-A-Vermehrung ist in CrFK-Zellen sehr effizient. In einer Studie war die Replikationsfähigkeit in CrFK-Zellen im Vergleich zu humanen und anderen tierischen Zellen bereits nach zwei Tagen am stärksten (NAKATA et al., 2003). 1968 wurde erstmals nach elf Tagen die FeLV-Replikationsfähigkeit in feline Zellen elektronenmikroskopisch beobachtet. Dabei bestand kein morphologischer Unterschied zwischen den infizierten und nicht-infizierten Zellen (JARRETT et al., 1968), was auf eine geringe Zytotoxizität von FeLV hindeuten könnte. Ferner wurden im Plasma von FeLV-infizierten Katzen nach sieben Tagen ca. 10^4 Fokus-bildende Einheiten (focos forming units, FFU) nachgewiesen (FRANCIS et al., 1977). Dies konnte auch in FeLV-A-infizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) beobachtet werden (NAKATA et al., 2003). Weiterhin wurde in FeLV-A/Glasgow-1-infizierten feline embryonalen Fibroblasten (FEA)-Zellen schon nach zwölf Stunden eine Integration des Provirus nachgewiesen (CATTORI et al., 2006). In FeLV-A/Glasgow-1-infizierten-HEK293-Zellen waren nach 72 Stunden bereits 60 FFU pro Mikroliter im Zellkulturüberstand vorhanden (STEWART et al., 2012). Auch wenn in der vorliegenden Studie nach zwölf Tagen vor Transfektion der siRNAs virale RNA und p27-Antigen in den Zellkulturüberständen nachweisbar waren, sollte in einer Folgestudie ein quantitativer Virusnachweis erfolgen. Dies wäre nicht zuletzt für die Beurteilung einer gezielten antiviralen Wirksamkeit durch siRNAs wichtig. In FCoV- und FHV-1-infizierten CrFK-Zellen wurde z. B. vor Transfektion der siRNAs ein Plaque-Assay durchgeführt (WILKES & KANIA, 2009; MCDONAGH et al., 2011).

In allen Zellkulturüberständen der mit siRNA-behandelten Zellen war im Vergleich zu den unbehandelten und AZT-behandelten Zellen ein geringerer Gehalt viraler RNA und p27-Antigen nachweisbar. Der Hemmeffekt der siRNAs war nach 48 Stunden am stärksten ausgeprägt. Danach nahm der Effekt kontinuierlich ab. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten von siRNA-behandelten FIV-infizierten Zellen überein (BABA et al., 2007). Eine siRNA kann bereits nach 15 Minuten aufgenommen werden und erreicht nach vier Stunden ein Plateau (GRUNWELLER et al., 2003). Die höchste siRNA-Aktivität ist gewöhnlich nach 24 Stunden erreicht und nimmt nach 48 Stunden ab (RAO et al., 2009).

In der vorliegenden Studie wurde u. a. die antivirale Wirksamkeit von siRNAs getestet, die komplementär zum FeLV-A-*env*-Gen (STEWART et al., 1986) waren. In anderen Studien wurde gezeigt, dass siRNAs gegen Hüllgene eine virale Vermehrung unterdrücken können. *In vitro* wurde z. B. die virale Replikation durch die dem HIV-*env*-Gen-komplementären doppelsträngigen RNAs (dsRNA) gehemmt (PARK et al., 2002). Auch dem bovinen Virus-Diarrhoe-Virus-Hüllgen-komplementäre siRNAs (MISHRA et al., 2011) und FHV-1-komplementäre gpD-siRNAs unterdrückten eine Virusvermehrung *in vitro* (WILKES & KANIA, 2009). Um eine spezifische Interferenz der *env*-siRNAs mit dem *env*-Gen nachzuweisen, könnte in einer weiteren Studie das gp70 quantifiziert werden.

Die mRNA des feline Wirtszellrezeptors feTHTR1 (MENDOZA et al., 2006) diente in dieser Studie als weiteres Angriffsziel für die siRNAs. Um eine Wirtszelle zu infizieren, bindet FeLV über das gp70 (*env*) an den für FeLV-A von der Wirtszelle spezifisch synthetisierten feline Wirtszellrezeptor feTHTR1. Nach Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran gelangt das virale Material in die Wirtszelle. Für HIV-1 wurde gezeigt, dass die Virusreplikation über eine Interferenz mit dem CD4⁺-Rezeptors oder der CCR5- und CXCR4-Korezeptoren gehemmt wurde (MARTINEZ et al., 2002; NOVINA et al., 2002; LEE et al., 2003; QIN et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde in den rez-siRNA-behandelten Zellkulturüberständen ein geringer Gehalt viraler RNA und des p27-Antigens gemessen. Die antivirale Wirkung der langen rez-siRNA war allerdings deutlich stärker ausgeprägt als die der kurzen rez-siRNA. Dies könnte durch die unterschiedlichen Nukleotid-Längen zustande gekommen sein. Während in manchen Studien keine Unterschiede in der Wirksamkeit durch unterschiedlich

lange siRNAs beobachtet wurden, konnte in einer Studie mit FHV-1-infizierten Zellen eine bessere Wirksamkeit durch lange (27 Nukleotide) siRNAs erzielt werden (WILKES & KANIA, 2009). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass, im Gegensatz zu den 21 Nukleotid-langen siRNAs, 27 Nukleotid-lange siRNA eine stärkere und länger anhaltende Hemmung der Expression eines modifizierten grün fluoreszierenden Reportergens (GFP) in HEK293-Zellen hatten. 27 Nukleotid-lange siRNAs werden im Gegensatz zu 21 Nukleotid-langen siRNAs durch das Enzym Dicer prozessiert, was einen positiven Einfluss auf die Kinetik des RNAi-Mechanismus gehabt haben könnte. Die 21 Nukleotid-langen siRNAs waren zwei Tage und die 27 Nukleotid-langen siRNAs zehn Tage wirksam. Ein unspezifischer immunmediierter Einfluss wurde dabei nicht beobachtet (KIM et al., 2005). Eine weitere Erklärung für die bessere Wirkung der langen rez-siRNA könnte die vorgenommene Modifikation der kurzen siRNAs sein. Die kurzen siRNAs wurden im Gegensatz zu den langen siRNAs mit Phosphorothioat- und 2'-O-Methyl-Bindungen modifiziert. Dies könnte eine Bindung an die Rezeptor-mRNA gestört und die Wirksamkeit der siRNA vermindert haben. Bei der kurzen env-siRNA wurde dieses Phänomen allerdings nicht beobachtet. Dies könnte auf unterschiedliche Zielgene zurückgeführt werden (KIM et al., 2005). Für den Nachweis eines spezifischen Einflusses der rez-siRNAs könnte die feTHTR1-mRNA quantitativ bestimmt werden.

In der vorliegenden Studie wurde die env- und rez-siRNA in equimolarer Menge kombiniert (env/rezS, env/rezL). Der Gehalt viraler RNA- und des p27-Antigens in den Zellkulturüberständen der mit den kombinierten siRNA-behandelten Zellen hat sich nicht signifikant von dem Gehalt in den Zellkulturüberständen der env- und rez-siRNA-behandelten Zellen unterschieden. Dennoch könnte eine Kombination verschiedener Zielgene einer Resistenzentwicklung vorbeugen und trotz viraler Mutationen an Zielgene binden (WILSON & RICHARDSON, 2005). In Studien wurde gezeigt, dass kombinierte siRNAs entweder ein stärkeres (JI et al., 2003; YE & JIN, 2006) oder kein stärkeres antivirales Hemmpotential haben können (LEE et al., 2003).

Auch in den Zellkulturüberständen der nicht zu env oder feTHTR1 komplementären siRNAs waren signifikant weniger virale RNA und p27-Antigen im Vergleich zu den AZT-behandelten und unbehandelten Zellen nachweisbar. In der vorliegenden Studie wurden siRNAs komplementär zum Koi-Herpesvirus

(khv) eingesetzt, da eine Virussequenz ohne Beziehung zu der spezifischen Zielsequenz eine geeignetere Kontrolle darstellen kann als eine veränderte oder willkürlich zusammengesetzte Sequenz (SCHYTH et al., 2006). Die khv-siRNAs hatten keine Komplementarität zu dem FeLV-A/Glasgow-1-Genom. Dies wurde mithilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) untersucht. In anderen Studien wurden siRNA-Kontrollen komplementär zum Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (GADPH) (KAPADIA et al., 2003) oder dem GFP (MCDONAGH et al., 2011; ORNELAS et al., 2012) verwendet. In einer Folgestudie könnte zusätzlich der Einsatz von unspezifischen siRNAs, z. B. gegen ein Reportergen, im Vergleich zu nicht-komplementären siRNAs, z. B. gegen eine andere Virussequenz als die Zielsequenz, verglichen werden, um eine mögliche Interferenz ausschließen zu können.

Eine mögliche Ursache für die Unterdrückung der FeLV-Vermehrung durch die khv-siRNAs könnte sein, dass sie auf einer anderen Stufe mit dem FeLV-A-Replikationszyklus oder mit anderen Regionen des feline Genus interferierten. Sogenannte „off-target“-Effekte durch siRNAs können auftreten, wenn andere Gene partielle Sequenzübereinstimmungen mit dem Zielgen haben (JACKSON et al., 2006b; CHEN & ZHANG, 2012; NAITO & UI-TEI, 2013). Es ist auch eine Interferenz der env-siRNAs mit dem endogenen FeLV (RD-114, enFeLV) möglich, obwohl sich die Sequenzen zwischen dem endogenen und exogenen FeLV in der U3-Region der „Long Terminal Repeat“ und des *env* unterscheiden (CASEY et al., 1981; BERRY et al., 1988; KUMAR et al., 1989). EnFeLV ist im Genom von Katzenzellen vorzufinden, kann sich mit FeLV-A rekombinieren und die Pathogenität steigern (HARTMANN & HEIN, 2008). Allerdings wurde in CrFK-Zellen kaum enFeLV nachgewiesen (OKADA et al., 2011). Um mögliche Interferenzen dennoch zu vermeiden, könnten Zellen verwendet werden, die kein enFeLV enthalten, wie z. B. HEK293-Zellen (NAKATA et al., 2003) oder Tetherin-CrFK-Zellen (FUKUMA et al., 2013).

Ferner ist die Wirksamkeit von siRNAs von der Verfügbarkeit der Zielsequenz, der Stabilität der siRNA und der mRNA-Struktur abhängig. Je stabiler die Zielsequenz umso weniger effizient ist die Wirksamkeit einer siRNA (CHEN & ZHANG, 2012). Dafür ist auch eine geeignete siRNA-Konzentration essentiell, da durch zu hohe oder zu niedrige siRNA-Konzentrationen Nebenwirkungen

entstehen können (JACKSON et al., 2003; PERSENGIEV et al., 2004; SEMIZAROV et al., 2004). In einer Studie wurden unspezifische Interferenzen bei siRNA-Konzentrationen von 0,2 bis 0,025 μM beobachtet, wobei diese Effekte mit zunehmend geringeren Konzentrationen abnahmen (PERSENGIEV et al., 2004). In einer weiteren Studie wurden unspezifische Effekte bei einer siRNA-Konzentration von 0,1 μM aber nicht bei 0,02 μM beobachtet (SEMIZAROV et al., 2004). In den meisten Studien wurde eine siRNA-Konzentration von 0,1 μM verwendet. Diese wird u. a. auch von einigen Herstellern empfohlen, obwohl unspezifische Interferenzen beobachtet werden können (PERSENGIEV et al., 2004). In anderen Studien wurde sogar eine siRNA-Konzentration von 0,2 μM verwendet (WU et al., 2003; BABA et al., 2007). Dabei war in FHV-1-infizierten Zellen schon eine milde Granulierung zu erkennen, als diese mit 0,1 μM einer 21 Nukleotid-langen siRNA behandelt wurden. Bei 0,05 μM der 21 Nukleotid-langen siRNA waren diese Nebeneffekte nicht mehr erkennbar (WILKES & KANIA, 2009). Diese Konzentration wurde auch in der vorliegenden Studie verwendet. In FHV-1-infizierten Zellen zeigten 0,05 μM einer 27 Nukleotid-langen siRNA eine milde Granulierung (WILKES & KANIA, 2009). In der vorliegenden Studie könnte es bei den 27 Nukleotid-langen siRNAs auch zu solch einem Nebeneffekt gekommen sein, der einen Einfluss auf die Zellviabilität gehabt haben könnte.

Weiterhin ist die siRNA-Gestaltung für eine spezifische und effektive Wirksamkeit entscheidend. Das 5'-Phosphat ist elementar für den Einbau in RISC und eine gezielte Spaltung, die zwischen dem zehnten und elften Nukleotid vom 5'-Ende ausgeht (ELBASHIR et al., 2001b). Dabei stören vier bis fünf unpaare Nukleotide vom 5'-Ende zwar nicht die Bindung an die Spaltstelle, können aber die Effizienz der Spaltung beeinflussen (HALEY & ZAMORE, 2004; MARTINEZ & TUSCHL, 2004). Für die Herstellung von siRNAs sollten speziell entwickelte Programme verwendet werden, die automatisch gewisse Grundregeln für eine siRNA-Gestaltung berücksichtigen. Dadurch können unspezifische Effekte vermindert und die Effektivität und Spezifität von siRNAs enorm gesteigert werden. In dieser Studie wurden die siRNA-Sequenzen mittels DEQOR konstruiert. Über DEQOR kann ein siRNA-Hemmpotential ermittelt und geeignete Regionen für eine Spaltung der Zielregion gefunden werden (HENSCHL et al., 2004). Eine Herstellung von siRNAs alleine mittels BLAST

hat womöglich den Nachteil, dass „off-target“-Effekte übersehen werden könnten (BIRMINGHAM et al., 2006). Dennoch wurde z. B. für die Herstellung von siRNAs gegen FCoV *in vitro* BLAST verwendet (MCDONAGH et al., 2011). Für die Herstellung einer siRNA ist nicht nur die Komplementarität zu den beabsichtigten Zielgenen wichtig. Es kommt insbesondere auch auf deren Bindungsstabilität an. Kürzlich wurde eine thermodynamische Genomanalyse (PICKY) für die Herstellung von siRNAs entwickelt. PICKY kann „off-target“-Gene identifizieren, die innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs zu einer siRNA hybridisiert werden könnten. So können geeignete siRNAs noch spezifischer herausgefiltert werden, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu „off-target“-Effekten führen würden (CHEN et al., 2013).

Weiterhin können „off-target“-Effekte durch eine spezifische Interferenz mit dem siRNA-Begleitstrang auftreten. Diese Interferenz muss keinen Einfluss auf die Spaltung des Zielgens haben (JACKSON et al., 2003). Unabhängig von der Transfermethode kann dieser Effekt auch bei der Verwendung von shRNAs auftreten (JACKSON et al., 2006a). Eine Interferenz mit dem Begleitstrang könnte durch eine Modifikation des Begleitstranges mit der universellen Base 5-Nitroindol (Position 15) (ZHANG et al., 2012) oder 2'-O-Guanidinopropyl (Positionen zwei bis 21) (MARIMANI et al., 2013) unterdrückt werden. Spezifische „off-target“-Effekte können schon bei einer Komplementarität von sieben Nukleotiden auftreten (LIN et al., 2005). Es ist eine Komplementarität zwischen dem zweiten bis siebten Nukleotid vom 5'-Ende des siRNA-Begleit- oder Leitstranges entscheidend (JACKSON et al., 2006b). Diese Region ist wichtig für die Bindung des endogenen RNAi-Mechanismus über mikro-RNAs, die in dieser sogenannten „seed“-Region komplementär zu den 3'-untranslatierten Randbereichen (UTR) einer mRNA sind (RAO et al., 2009). Spezifische „off-target“-Effekte durch siRNAs oder shRNAs sind mit einem endogenen RNAi-Effekt vergleichbar (BIRMINGHAM et al., 2006; VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006). Daher sind geeignete Untersuchungsmethoden für die Herstellung von siRNAs und shRNAs von entscheidender Bedeutung, um diese „off-target“-Regionen und Interferenzen so weit wie möglich zu vermeiden. Während BLAST sich dafür nur wenig effektiv gezeigt hat (BIRMINGHAM et al., 2006), bewähren sich DEQOR oder PICKY. Neben den beschriebenen Modifikationen können auch ein bis zwei unpaare Basen zwischen einer siRNA und der Zielsequenz eine

Interferenz mit der 3'-UTR-Region vermeiden (RAO et al., 2009).

Ferner könnte eine Interferenz der siRNAs mit der RT aufgetreten sein. Als Polyanion können siRNAs mit dem Template konkurrieren und eine Hemmung der RT verursachen. In aviären Myeloblastosis-Virus- und HIV-infizierten Zellen war die antivirale Wirksamkeit von Phosphorothioat- und 2'-O-Methyl-modifizierten und nicht-modifizierten Oligonukleotiden (ON) sequenzunabhängig und auf eine Bindung an die RT zurückzuführen (HATTA et al., 1993). Dieser Effekt wurde auch in Herpes-Simplex-Virus-infizierten Zellen beobachtet (GAO et al., 1989). In einer *in-vivo*-Studie führten Kontroll-ON nach 14 Tagen zu einer Besserung einer Herpes-induzierten stromalen Keratitis bei Mäusen. Dieser Effekt war vermutlich unspezifisch (WASMUTH et al., 2008).

Die FeLV-Vermehrung in den khv-siRNA-behandelten Zellen könnte auch durch unspezifische „off-target“-Effekte unterdrückt worden sein, die nicht durch eine spezifische Interaktion durch den RNAi-Mechanismus ausgelöst wurden (RAO et al., 2009). Für unspezifische Effekte ist insbesondere eine Immunstimulation verantwortlich (JACQUE et al., 2002; HORNUNG et al., 2005; JUDGE et al., 2005; SIOUD, 2005; SCHYTH et al., 2007). Aber auch Zytotoxizitäten und über Vektoren vermittelte Nebenwirkungen zählen dazu (RAO et al., 2009). Bei dsRNA-Molekülen von mehr als 30 Nukleotiden wurde eine Proteinkinase R-vermittelte Immunstimulation *in vitro* beobachtet, wie es natürlicherweise bei viralen Infektionen geschehen würde (BUMCROT et al., 2006). Auch wenn siRNAs aus weniger als 30 Nukleotiden bestehen, kann eine Immunstimulation über eine Bindung an „Toll-like“-Rezeptoren (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) eine Zytokinproduktion anregen (ELBASHIR et al., 2001a; JACQUE et al., 2002; JUDGE et al., 2005; SIOUD, 2005) und dadurch das Immunsystem stimulieren (DE VEER et al., 2005; SHARMA & RAO, 2009). SiRNAs können eine Antikörper-Bildung gegen HCV *in vivo* stimulieren (REN et al., 2013). In einer Studie wurde eine Zytokinproduktion infolge viraler Infektionen in Katzenzellen untersucht. Nach sechs Stunden war in FeLV-infizierten FEA-Zellen und nach 24 Stunden in FHV-infizierten CrFK-Zellen eine Zytokinproduktion nachweisbar (ROBERT-TISSOT et al., 2011). In der vorliegenden Studie wurden CrFK-Zellen verwendet. Es wäre also möglich, dass die FeLV-Vermehrung in dieser Studie durch eine Immunstimulation, auch unabhängig von einem RNAi-Mechanismus,

unterdrückt worden ist. In einer Folgestudie wäre es somit wichtig den Einfluss einer möglichen Immunstimulation zu bestimmen. Dafür könnte z. B. die IFN- β -mRNA mittels PCR gemessen werden (WILKES & KANIA, 2009). In einigen Studien wurde diskutiert, ob Guanin-Uracil (GU)-reiche siRNA-Sequenzen eine virale Interferenz auslösen könnten. Insbesondere wurden unspezifische Einflüsse durch GU-reiche Sequenzen über eine Immunstimulation beschrieben. Es wurden Adenin-Uracil (AU)-reiche Sequenzen empfohlen, um eine Immunstimulation zu umgehen (DE VEER et al., 2005). Allerdings kann auch durch AU-reiche Sequenzen eine Immunantwort ausgelöst werden (GU et al., 2009). Ferner ist fraglich, ob sich eine Immunantwort durch GU-reiche Sequenzen in der Zellkultur überhaupt mit einer endogenen Aktivierung des Immunsystems vergleichen lässt (JUDGE et al., 2005). Der Einbau chemischer Modifikationen, wie auch die in der vorliegenden Studie verwendeten Phosphorothioat- und 2'-O-Methyl-Gruppen, sollten eigentlich vor solchen unspezifischen Mechanismen schützen (BRAASCH et al., 2003; KURRECK, 2003; JACKSON et al., 2006b). Ein Einfluss zytotoxischer Effekte kann in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden. Dies kann wie oben beschrieben durch hohe siRNA-Konzentrationen hervorgerufen werden. Eine Zytotoxizität kann auch durch FeLV selbst hervorgerufen worden sein. Die Zellviabilität wurde in der vorliegenden Studie täglich mikroskopisch untersucht. Zudem zeigte sich bei jedem Wechsel des Zellkulturmediums ein eindeutiger Farbumschlag des alten Mediums. Dies deutet ebenfalls auf eine Vitalität der Zellen hin. Dennoch sollte in einer Folgestudie ein Zytotoxizitätsnachweis (z. B. MTT-Test) durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu anderen Studien (HOOVER et al., 1990; ZEIDNER et al., 1990) konnte die als Kontrolle in der vorliegenden Studie verwendete Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ AZT die FeLV-Vermehrung *in vitro* nicht hemmen. In den anderen Studien, in denen AZT wirksam war, wurden die CrFK-Zellen bereits 24 Stunden vor einer FeLV-Infektion mit AZT behandelt. Eine AZT-Konzentration von 0,5 – 5 $\mu\text{g/ml}$ führte in diesen Studien zu einer vollständigen Hemmung der Virusreplikation, ohne dabei zytotoxische Nebeneffekte zu provozieren. Ein möglicher Grund für die fehlende Wirkung von AZT in der aktuellen Studie könnte der Infektionszeitpunkt sein. In den anderen Studien wurde AZT vor der Infektion der Zellen appliziert. In der aktuellen Studie waren die Zellen dagegen vor Applikation von AZT bereits zwölf Tage infiziert. Ein weiterer Grund für eine

fehlende Wirkung von AZT könnte die nur einmalige Applikation von AZT darstellen. In Vergleichsstudien wurden die Zellen täglich mit AZT behandelt. In der vorliegenden Studie wurde von einer mehrtägigen AZT-Gabe abgesehen, da die AZT-behandelten Zellen als Vergleichskontrolle zu den siRNA-behandelten Zellen dienten. Auf der anderen Seite kann auch eine Resistenzentwicklung der infizierten CrFK-Zellen gegenüber AZT nicht ausgeschlossen werden. Eine Resistenzentwicklung wurde bereits in einer Studie mit FIV-infizierten Zellen entdeckt (REMINGTON et al., 1991). In einer nachfolgenden Studie könnte eine tägliche AZT-Behandlung mit einer siRNA-Behandlung verglichen werden. Auch wenn das Behandlungsintervall dann unterschiedlich wäre, kann dennoch der Einfluss von AZT auf die FeLV-Vermehrung erfasst und mit den siRNA-behandelten Zellen verglichen werden. Weitergehend wäre es interessant auch unterschiedliche Applikationsintervalle von siRNAs zu beobachten und mit AZT zu vergleichen. Dafür könnten FeLV-infizierte Zellen täglich mit siRNAs behandelt und eine antivirale Wirksamkeit mit AZT-behandelten Zellen im gleichen Applikationsintervall verglichen werden. Für die Kontrolle der Hemmung einer FeLV-Vermehrung durch siRNAs und AZT wären Untersuchungen auf eine Zytotoxizität und der Einfluss einer Immunstimulation zu berücksichtigen.

Kürzlich wurde in einer Studie die antivirale Wirkung von shRNAs gegen das FeLV-A/Rickard-*gag*-Gen in FeLV-infizierten-Zellen untersucht (ORNELAS et al., 2012). Dafür wurden Zellen u. a. gleichzeitig mit FeLV infiziert und shRNAs behandelt. Dabei geben die Autoren keine Information zu einer etablierten FeLV-Infektion an. Bei zwei von drei shRNA-Molekülen konnte nach 48 Stunden mittels Immunoblot eine Verringerung des p27-Antigens um ca. 40 % bis 70 % nachgewiesen werden. Die Untersuchung der RT-Aktivität zeigte einen Hemmeffekt in einer ähnlichen Größenordnung. Das *gag*-Gen könnte somit ebenfalls ein geeignetes Angriffsziel für siRNAs darstellen. Allerdings wurde im Gegensatz zur aktuellen Studie nicht der Gehalt viraler RNA untersucht und das p27-Antigen mittels Densitometrie untersucht. Die Sequenzidentität zwischen FeLV-A/Rickard- und dem in der aktuellen Studie verwendeten FeLV-A/Glasgow-1-Subtyp wird auf etwa 76 % bis 78 % geschätzt (ROSENBERG et al., 1980). Es wäre sehr interessant, diesen Ansatz auch in FeLV-A/Rickard-infizierten und in FeLV-A/Glasgow-1-infizierten Zellen zu untersuchen. Dadurch

wäre ein Vergleich einer antiviralen Wirksamkeit zwischen den beiden Subtypen möglich.

Auf der Homepage der Firma BioinGentech (Chile) wird ein auf RNAi-basierendes FeLV-Therapeutikum angeboten („VetRNAi F003; siRNA FeLV, Inhibitor of viral replication Feline Leukemia Virus“, <http://rnaivet.com/RNAi%20Based%20Therapeutics%20FeLV.php>). Es gibt allerdings keine Informationen, wie das Medikament getestet wurde. In der Produktinformation steht, dass es als ein antivirales, antiproliferatives und immunmodulierendes Medikament einen Schutz vor FeLV, oder bei vorliegender FeLV-Infektion, eine Kontrolle der FeLV-Infektion ermöglicht. Ferner ist dort beschrieben, dass das Medikament als Pulver über das Trinkwasser gegeben werden soll. Die Bioverfügbarkeit einer oral verabreichten siRNA ist allerdings fraglich. Bis heute wird nach geeigneten Applikationstechniken für oral verabreichte siRNAs geforscht (AOUADI et al., 2009; WHITEHEAD et al., 2009; MOHANAN et al., 2010; WILSON et al., 2010; PECOT et al., 2011; HE et al., 2013). Die Firma gibt nicht an, in welchem Zeitraum eine Katze das mit siRNA versetzte Wasser trinken sollte. Laut Produktinformation kann das Medikament auch injiziert oder auf einem anderen Weg, der nicht angegeben wird, absorbiert werden. Hierfür sei der Tierarzt heranzuziehen. Ein Vergleich der Wirksamkeit zwischen den verschiedenen Applikationstechniken wäre interessant, ist in der Produktinformation aber auch nicht aufgeführt. Der Hersteller rät von zeitgleich durchgeführten Therapien, insbesondere mit Antibiotika, ab. Als Nebenwirkungen werden milde respiratorische Symptome angegeben. Es gibt jedoch keinerlei publizierte Studien.

Eine geeignete siRNA-Dosierung und ein passender Transportmechanismus sind notwendig, damit die siRNA vor Ankunft am Zielorgan nicht vom Körper abgebaut wird. Dabei kann der Einsatz von nicht-viralen und viralen Vektoren nützlich sein. Virale Vektoren sind im Vergleich zu nicht-viralen Vektoren wirksamer (ZHANG et al., 2007; LUTEN et al., 2008). Sie schleusen shRNAs direkt in das Wirtszellgenom ein. In einer Studie wurde ein mit shRNA beladener Moloney-Murin-Leukämievirus-Vektor erfolgreich gegen HCV eingesetzt (KRONKE et al., 2004). Allerdings können diese Vektoren in der Nähe von Protoonkogenen eingebaut und diese dadurch aktiviert werden (SCHMIDT et al.,

2002; HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003; HACEIN-BEY-ABINA et al., 2008), wobei dieses Problem durch Modifikationen vermindert werden könnte (KVARATSKHELIA et al., 2014). In einer FIV-Zellkulturstudie wurden shRNAs über einen lentiviralen (HIV-1-) Vektor in das Wirtszellgenom integriert. Durch die stetige shRNA-Expression konnte so eine stabile Wirkung und FIV-Hemmung erreicht werden (HARPER et al., 2006; BABA et al., 2008). T-Lymphozyten von HIV-Patienten wurden mit antisense RNAs gegen HIV mit einem lentiviralen Vektor transfiziert. Anschließend wurden diese T-Zellen den Patienten wieder zugeführt (DROPULIC, 2001; DAVIS et al., 2004). Hämatopoetische Stammzellen konnten auch mit einem siRNA-beladenen lentiviralen Vektor transfiziert werden, der den Patienten intravenös verabreicht wird (HANNON & ROSSI, 2004). In Primaten wurde die Effektivität von siRNAs untersucht. Diese wurden über ein CD34⁺-hämatopoetisches Stammzelltransplantat gegen einen HIV-Chemokin-Korezeptor CCR5 gerichtet, dessen Expression darüber gehemmt werden konnte. Auch nach 14 Monaten konnte eine stetige Expression dieser siRNAs und Hemmung der CCR5-Expression beobachtet werden. Dabei wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Die Autoren dieser Studie postulieren, dass dieses siRNA-Transplantat eine Behandlungsmöglichkeit für HIV-infizierte Menschen darstellen könnte (AN et al., 2007).

Auch nicht-virale Transportoptionen sind beschrieben. Typischerweise werden dafür Ansätze mit Kationen hergestellt. Die positive Ladung der Kationen unterstützt die Bindung der siRNAs an die negativ geladenen Nukleinsäuren und Glykokalix der Zellmembran. Durch die positive Ladung der Kationen können aber auch toxische Nebeneffekte auftreten (ZHANG et al., 2007; KIM et al., 2009). Weiterhin können monoklonale Antikörper und Peptide als nicht-virale Vektoren eingesetzt werden (HUGHES & RAO, 2005; VORHIES & NEMUNAITIS, 2007). Diese binden an die Zellmembran und werden dann über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Eine weitere Möglichkeit sind lipid-basierte Nanopartikel, wie das „lipid-PEG“-Konjugat (MOREIRA et al., 2008). In einer Studie wurden Polyethylamin-kombinierte siRNAs erfolgreich in Influenza-infizierte Mäuse eingeschleust und damit therapiert (GE et al., 2004). Ferner wurde der Einsatz von Aptameren diskutiert. Diese einzelsträngigen RNA- oder DNA-Moleküle binden Proteine, z. B. Rezeptoren, an der Zelloberfläche und fördern die siRNA-Aufnahme in eine Zelle (DOVE, 2010; LI et al., 2013).

In der aktuellen Studie wurden die siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagens in die CrFK-infizierten Zellen eingeschleust. HiPerFect besteht aus Kationen und neutralen Lipiden. Laut Hersteller (Qiagen) ist damit ein effektives Einschleusen niedriger siRNA-Konzentrationen in Zellen möglich. HiPerFect wurde auch in vielen anderen Studien mit siRNAs in Zellkulturen verwendet. In einer Studie wurden siRNAs in humane vaskuläre Aorta-Endothelzellen mit HiPerFect transfiziert (NABZDYK et al., 2011). Dabei wurde keine Zelltoxizität durch das Transfektionsmittel beobachtet. In einer anderen Studie wurde kein Einfluss von HiPerFect auf die Zellviabilität beobachtet (FORSBACH et al., 2012). Die Autoren beschreiben, dass eine Transfektion der RNAi nicht von der Partikelgröße oder Oberfläche des Transfektionsmittels abhängig ist, sondern von der Fähigkeit die siRNA in das Zytoplasma zu entlassen. Von dort aus wird die siRNA von RISC aufgenommen und der RNAi-Mechanismus gestartet. Andere Transfektionsmittel (z. B. DOTAP, ESCORT, Lipofectamin) behinderten den Prozess der siRNA-Freilassung in das Zytoplasma sogar. Die Transfektionsmittel riefen eine Immunstimulation hervor, die den RNAi-Effekt beeinflussen kann. So wurde durch HiPerFect die Aktivität von Tumornekrosefaktor-alpha und IFN *in vitro* sogar gehemmt. In *in-vitro*-Studien lag die HiPerFect-siRNA-Transfektionseffizienz bei ca. 61 % (YE et al., 2011) und 70 % bis 80 % (ZHAO et al., 2008) . In einer nachfolgenden Studie sollte eine siRNA-Transfektion, z. B. mittels fluoreszenzmarkierter siRNAs, nachgewiesen werden.

Auch bifunktionale shRNAs könnten einen interessanten therapeutischen Ansatz gegen virale Infektionen darstellen. Sie bestehen aus zwei Anteilen. Der eine Anteil besteht aus einem zur Ziel-mRNA komplementären Leit- und Begleitstrang. Der andere Anteil ist zwischen dem neunten und zwölften Nukleotid nicht komplementär zur Ziel-mRNA. Dadurch werden im RISC ein sequenzabhängiger und eine sequenzunabhängiger „Gen-Knockdown“ durchgeführt. Es werden gleichzeitig die komplementäre Ziel-mRNA abgebaut und die Translation verhindert. Durch den bifunktionalen Mechanismus haben diese shRNAs im Vergleich zu shRNAs und siRNAs eine sehr hohe Effektivität (RAO et al., 2009).

Phosphorothioat- und 2'-O-Methyl-siRNA-Modifikationen, die auch in der

vorliegenden Studie verwendet wurden, verbessern die Stabilität im Serum und die Wirksamkeit. Phosphorothioat-Modifikationen vermindern die Gefahr einer vorzeitigen Spaltung durch Nukleasen und Integrasen. Des Weiteren erhöhen sie die Bindung an Proteine im Serum und erhöhen somit die Bioverfügbarkeit. 2'-O-Methyl-Modifikationen vermindern auch die Gefahr eines vorzeitigen Abbaus durch Nukleasen und erhöhen die thermodynamische Stabilität (BRAASCH et al., 2003).

Eine Wirksamkeit von siRNAs *in vitro* ist nur bedingt mit einer Wirksamkeit *in vivo* zu vergleichen. Die Wirksamkeit von siRNAs in Mäusen (GE et al., 2004; TOMPKINS et al., 2004) und Primaten (AN et al., 2007) waren mit der Wirksamkeit in Zellkulturen vergleichbar. In Mäusen wurde die Wirksamkeit von siRNAs gegen das Influenza-A-Virus *in vivo* untersucht (TOMPKINS et al., 2004). Die Virustiter im Lungengewebe waren zwei Tage post mortem signifikant geringer als die der Kontrollgruppe. Die Hemmung der Virusvermehrung war *in vitro* und *in vivo* vergleichbar (GE et al., 2003; GE et al., 2004; TOMPKINS et al., 2004). Die Zellen wurden zwei Stunden vor der siRNA-Behandlung mit dem Influenza-A-Virus infiziert. Nach 60 Stunden war der Virusgehalt der mit siRNA-behandelten Zellen ca. achtmal geringer als in der Zellen, die keine Therapie bekommen hat (GE et al., 2003). In der vorliegenden Studie war der Gehalt viraler RNA nach 48 Stunden in den Überständen der siRNA-behandelten Zellen zwischen 0,7-fach (rezS-siRNA) und 17,5-fach (envS-siRNA) geringer im Vergleich zu den Überständen der Kontrollen (AZT und Leerprobe), obwohl die Zellen bereits 13 Tage infiziert waren. In Rhesus-Makaken wurde die Effektivität von Vektoren übertragene shRNAs gegen die Expression des Korezeptors CCR5 untersucht. Die Expression der shRNAs *in vitro* war laut Angabe der Autoren mit der Expression *in vivo* vergleichbar. Die Expression des Rhesus-Korezeptors CCR5 konnte wirksam gehemmt werden (AN et al., 2007).

Ein Nachteil der RNAi-Therapie sind Mutationen von Viren im Feld. Synthetisch hergestellte siRNAs können dann keine spezifische Bindung mit dem mutierten Virus mehr eingehen. Auch die Entstehung viraler Resistenzen würde eine effektive Wirkung von siRNAs behindern. Dieses Phänomen wird insbesondere bei RNA-Viren beobachtet, da deren virale Polymerase unspezifisch ist. Eine Kombination aus siRNAs, die unterschiedliche Zielgene angreifen, könnte einer

Resistenzbildung vorbeugen. Eine solche Kombination wurde bereits in *in-vitro*-Studien mit HIV und HCV (BODEN et al., 2003; DAS et al., 2004; WILSON & RICHARDSON, 2005; WU et al., 2005) sowie in der vorliegenden Studie durchgeführt.

In der vorliegenden Studie kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, wodurch die Hemmung der FeLV-Vermehrung tatsächlich verursacht wurde, da auch in den Zellkulturüberständen der nicht-komplementären siRNAs ein geringerer Gehalt viraler RNA und des p27-Antigens nachgewiesen wurde. Eine mögliche Wirksamkeit der siRNAs gegen eine FeLV-Vermehrung kann auch nur durch spezifische und unspezifische „off-target“-Effekte ausgelöst worden sein. Um einen spezifischen Einfluss von env- und rez-siRNAs auf eine FeLV-A/Glasgow-1-Vermehrung nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen nötig. Auch experimentelle Fehler, z. B. beim „annealing“ der siRNAs, bei der Transfektion des Virus oder der siRNAs, bei der Inkubation und Austausch des Zellkulturmediums, können nicht ausgeschlossen werden. Für eine spezifische Interferenz der siRNAs mit den Zielgenen könnten in einer Folgestudie die feTHTR1-mRNA und das gp70 quantitativ bestimmt werden. Hinzukommend sollte eine dosisabhängige Wirkungskinetik der siRNAs durchgeführt werden. Ferner könnten fluoreszenzmarkierte siRNAs verwendet werden, um eine Transfektion und Stabilität der siRNAs zu untersuchen. Des Weiteren ist ein quantitativer Virusnachweis erforderlich. Weiterhin ist auch ein Zytotoxizitätsnachweis, um den Einfluss von siRNAs und des Virus auf die Zellviabilität zu untersuchen, wichtig. Ein immunmediierter Einfluss auf die virale Vermehrung könnte durch IFN-Messungen untersucht werden (SCHYTH et al., 2007; WILKES & KANIA, 2009).

Interessant könnte der Vergleich einer antiviralen Wirksamkeit FeLV-infizierter Zellen mit siRNA und shRNA sein. In einer weiteren Studie könnte das Provirus aus den Zellen extrahiert und mit der viralen RNA im Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert und verglichen werden. In einer Studie war die virale RNA bereits nach einer Woche im Plasma FeLV-infizierter Katzen nachweisbar. Dieser im Vergleich zum Provirus- und p27-Antigen-Nachweis sehr frühe Nachweis ist für die Beurteilung eines Infektionsverlaufs geeignet (TANDON et al., 2005).

Um die Wirkung von siRNAs in FeLV-infizierten Katzen zu erforschen, sind noch weitere *in-vitro*-Studien nötig. Für eine therapeutische Anwendung in FeLV-infizierten Katzen könnte auch der Infektionszeitpunkt für eine Therapie mit siRNAs ausschlaggebend sein. Dafür wären Untersuchungen zur Wirksamkeit von siRNAs in sowohl akut als auch chronisch FeLV-infizierten Zellen interessant. Für den Einsatz antiviraler Hemmstoffe ist grundsätzlich die Wirksamkeit gegen eine etablierte und persistierende FeLV-Infektion in Katzen wichtig, da in der Praxis symptomatische Katzen vorgestellt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Katzen, die mit dem feline Leukämievirus (FeLV) infiziert sind, können schwere Krankheitssymptome entwickeln. Viele antivirale Medikamente aus der Humanmedizin sind aufgrund schwerer Nebenwirkungen bei Katzen nicht anwendbar. Ein neuer Ansatz für die Behandlung von FeLV-infizierten Katzen könnten kurze RNA-Moleküle, sogenannte „small interfering RNAs“ (siRNAs), darstellen. siRNAs können über Basenpaarung an die virale RNA binden und dadurch eine Virusvermehrung hemmen. In vielen Studien wurde gezeigt, dass spezifische siRNAs die Replikation verschiedener RNA- und DNA-Viren *in vitro* und *in vivo* unterdrücken.

Ziel der Arbeit war es, die Wirksamkeit von siRNAs auf eine FeLV-A/Glasgow-1-Verbreitung in Crandell-Rees feline kidney-(CrFK-)Zellen zu untersuchen. Die infizierten CrFK-Zellen wurden nach 13 Tagen mit dem FeLV-Hüllgen (*env*) und der zellulären feline Rezeptor (feTHTR1)-mRNA komplementäre sowie nicht-komplementäre, 21 bis 27 Nukleotid-lange, siRNAs transfiziert. Als Kontrolle wurden die infizierten CrFK-Zellen mit 5 µg/ml Azidothymidin (AZT) und einer Leerprobe, die weder siRNA noch AZT enthielt, behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 24 Stunden abgenommen und auf den Gehalt viraler RNA mittels quantitativer real time RT-PCR und das FeLV-p27-Antigen mittels ELISA untersucht.

Der Gehalt viraler RNA und des p27-Antigens in den Zellkulturüberständen aller der mit siRNA-behandelten Zellen war nach 48 Stunden im Vergleich zu den Zellkulturüberständen der Leerprobe oder den AZT-behandelten Zellen signifikant geringer. Da dies auch bei den nicht-komplementären siRNAs nachweisbar war, ist eine spezifische antivirale Wirksamkeit der siRNAs gegen eine FeLV-Verbreitung in dieser Studie fraglich. Die FeLV-Verbreitung könnte durch eine unspezifische Bindung der siRNAs an das FeLV-Gen, einer Immunstimulation, einer Interferenz mit der Reversen Transkriptase, oder einer möglichen Zytotoxizität beeinflusst worden sein. In dieser Studie konnte die FeLV-Verbreitung durch AZT nicht unterdrückt werden. Dies könnte im Unterschied zu anderen Studien an der einmaligen Applikation gelegen haben.

Um eine spezifische antivirale Wirksamkeit von siRNA gegen eine FeLV-

Vermehrung nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen nötig. Dabei muss auch der Einfluss durch unspezifische Mechanismen berücksichtigt werden.

VI. SUMMARY

Infection with feline leukemia virus (FeLV) can lead to a clinical syndrome in cats that is hardly treatable until today. Antiviral compounds for the treatment of human infections are commonly toxic in cats. Therefore, new therapeutic strategies are needed to treat FeLV in cats. In this study, the use of “small interfering RNA” (siRNA) was investigated *in vitro*. Earlier studies showed good efficacy in inhibiting virus replication of different RNA and DNA viruses *in vitro* and *in vivo*. Post-transcriptionally, specific siRNAs, homologous to the target region of the complementary strain, can interfere with the target region and inhibit virus replication.

The aim of this study was to investigate the efficacy of siRNAs in FeLV-A/Glasgow-1-infected Crandell-Rees feline kidney (CrFK) cells. After 13 days, infected cells were transfected with either 21 or 27 nucleotide-long siRNAs, designed complementary to the FeLV envelope (*env*) gene, the mRNA of the specific cellular feline receptor (feTHTR1), or non-complementary to the target genes. As a control, cells were treated with 5 µg/ml azidothymidine (AZT) that has been determined to inhibit FeLV infection, and a mock transfection without containing siRNA or AZT. Culture supernatants were taken every 24 hours for five days, and viral RNA was quantified by real time RT-PCR and viral antigen p27 was quantified by ELISA.

In all cell culture supernatants of siRNA treated cells, viral RNA and p27 load were significantly lower compared to AZT and mock. Because this was also seen in the supernatants of the non-complementary siRNAs, a specific antiviral efficacy of siRNAs against FeLV replication is unclear. An antiviral effect on FeLV replication could have been caused by a binding to another region of the FeLV genome that is crucial for virus replication, through an interference of the feline cellular genome and thus inhibited cell structures that the virus uses for replication, or an inhibition due to a binding to the reverse transcriptase. Also, the effects might depend on an unspecific stimulation of the immune system or a cytotoxic effect. AZT did not show any efficacy in inhibiting viral replication. In other studies, AZT was added on a daily bases, which is different from this study.

Further investigations are necessary to determine a specific inhibition of FeLV

replication due to siRNA treatment, and any possible off-target effects still have to be clarified.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abrams DI, Kuno S, Wong R, Jeffords K, Nash M, Molaghan JB, Gorter R, Ueno R. Oral dextran sulfate (UA001) in the treatment of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med* 1989; 110: 183-8.

An DS, Donahue RE, Kamata M, Poon B, Metzger M, Mao SH, Bonifacino A, Krouse AE, Darlix JL, Baltimore D, Qin FX, Chen IS. Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13110-5.

Aouadi M, Tesz GJ, Nicoloso SM, Wang M, Chouinard M, Soto E, Ostroff GR, Czech MP. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature* 2009; 458: 1180-4.

Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a007161.

Baba K, Mizukoshi F, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Application of RNA interference for inhibiting the replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cell lines. *Vet Microbiol* 2007; 120: 207-16.

Baba K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 777-83.

Bagasra O, Lischner HW. Activity of dextran sulfate and other polyanionic polysaccharides against human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; 158: 1084-7.

Balzarini J, Holy A, Jindrich J, Naesens L, Snoeck R, Schols D, De Clercq E.

Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective *in vitro* and *in vivo* antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 332-8.

Barber AM, Hizi A, Maizel JV, Jr., Hughes SH. HIV-1 reverse transcriptase: structure predictions for the polymerase domain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6: 1061-72.

Baulcombe DC. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 1999; 2: 109-13.

Bebenek K, Roberts JD, Kunkel TA. The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication. *J Biol Chem* 1992; 267: 3589-96.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.

Berry BT, Ghosh AK, Kumar DV, Spodick DA, Roy-Burman P. Structure and function of endogenous feline leukemia virus long terminal repeats and adjoining regions. *J Virol* 1988; 62: 3631-41.

Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 2006; 3: 199-204.

Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* 2001; 9: 1225-36.

Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 2003; 77: 11531-5.

Boenzli E, Robert-Tissot C, Sabatino G, Cattori V, Meli ML, Gutte B, Rovero P, Flynn N, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. *In vitro* inhibition of feline leukaemia virus infection by synthetic peptides derived from the transmembrane domain. *Antivir Ther* 2011; 16: 905-13.

Boyer PL, Gao HQ, Clark PK, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. YADD mutants of human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase are resistant to lamivudine triphosphate (3TCTP) *in vitro*. *J Virol* 2001; 75: 6321-8.

Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA, Corey DR. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 2003; 42: 7967-75.

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003; 34: 263-4.

Bronson JJ, Ghazzouli I, Hitchcock MJ, Webb RR, 2nd, Martin JC. Synthesis and antiviral activity of the nucleotide analogue (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *J Med Chem* 1989; 32: 1457-63.

Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 711-9.

Callahan LN, Phelan M, Mallinson M, Norcross MA. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. *J Virol* 1991; 65: 1543-50.

Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 2002; 169: 5196-201.

Casey JW, Roach A, Mullins JI, Burck KB, Nicolson MO, Gardner MB, Davidson N. The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7778-82.

Cattori V, Tandon R, Pepin A, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Mol Cell Probes* 2006; 20: 172-81.

Cattori V, Weibel B, Lutz H. Inhibition of Feline leukemia virus replication by the integrase inhibitor Raltegravir. *Vet Microbiol* 2011; 152: 165-8.

Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93: 681-4.

Chang RS, Tabba HD, He YS, Smith KM. Dextran sulfate as an inhibitor against the human immunodeficiency virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 189: 304-9.

Chen J, Zhang W. Kinetic analysis of the effects of target structure on siRNA efficiency. *J Chem Phys* 2012; 137: 225102.

Chen X, Liu P, Chou HH. Whole-genome thermodynamic analysis reduces siRNA off-target effects. *PLoS One* 2013; 8: e58326.

Cherrington JM, Fuller MD, Mulato AS, Allen SJ, Kunder SC, Ussery MA, Lesnikowski Z, Schinazi RF, Sommadossi JP, Chen MS. Comparative kinetic analyses of interaction of inhibitors with Rauscher murine leukemia virus and human immunodeficiency virus reverse transcriptases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1270-3.

Clouser CL, Patterson SE, Mansky LM. Exploiting drug repositioning for discovery of a novel HIV combination therapy. *J Virol* 2010; 84: 9301-9.

Clouser CL, Bonnac L, Mansky LM, Patterson SE. Characterization of

permeability, stability and anti-HIV-1 activity of decitabine and gemcitabine divalente prodrugs. *Antivir Chem Chemother* 2014; 23: 223-30.

Clumeck N, Hermans P. Antiviral drugs other than zidovudine and immunomodulating therapies in human immunodeficiency virus infection. An overview. *Am J Med* 1988; 85: 165-72.

Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16: 861-5.

Cullen BR. RNAi the natural way. *Nat Genet* 2005; 37: 1163-5.

Dahlberg JE, Mitsuya H, Blam SB, Broder S, Aaronson SA. Broad spectrum antiretroviral activity of 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 2469-73.

Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R, Berkhout B. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 2004; 78: 2601-5.

Das K, Martinez SE, Bauman JD, Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 253-9.

Davis BM, Humeau L, Dropulic B. *In vivo* selection for human and murine hematopoietic cells transduced with a therapeutic MGMT lentiviral vector that inhibits HIV replication. *Mol Ther* 2004; 9: 160-72.

De Clercq E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 200-39.

De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 33: 307-

20.

De Clercq E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 99-109.

De Clercq E. Antivirals: past, present and future. *Biochem Pharmacol* 2013; 85: 727-44.

de Veer MJ, Sledz CA, Williams BR. Detection of foreign RNA: implications for RNAi. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 224-8.

Donahue PR, Hoover EA, Beltz GA, Riedel N, Hirsch VM, Overbaugh J, Mullins JI. Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *J Virol* 1988; 62: 722-31.

Dove A. An apt approach. *Nat Med* 2010; 16: 258-60.

Dropulic B. Lentivirus in the clinic. *Mol Ther* 2001; 4: 511-2.

Eckert DM, Kim PS. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001a; 98: 11187-92.

Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 2001b; 70: 777-810.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001a; 411: 494-8.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001b; 20: 6877-88.

EMA. Dacogen (decitabine). 2015; 15.03.2015a:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002221/human_med_001589.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

EMA. Didanosine. 2015; 15.03.2015b:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Didanosine/human_referral_000353.jsp&mid=WC0b01ac05805c516f.

EMA. Isentress (raltegravir). 2015; 15.03.2015c:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000860/human_med_000859.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

EMA. Tivicay (dolutegravir). 2015; 15.03.2015d:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002753/human_med_001720.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

FDA. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. 2015; 15.03.2015a:
<http://www.fda.gov/forpatients/illness/hivaids/treatment/ucm118915.htm>.

FDA. FDA Approval for Gemcitabine Hydrochloride. 2015; 15.03.2015b:
<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-gemcitabine-hydrochloride>.

FDA. FDA Approval for Decitabine. 2015; 15.03.2015c:
<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-decitabine>.

FDA. M.D./alert HIVID (zalcitabine). 2015; 15.03.2015d:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/DrugShortages/ucm086099.pdf>

FDA. Safety - Foscavir (foscarnet sodium) Injection. 2015; 15.03.2015e:
<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/ucm426501.htm>.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and

specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.

Flexner C, Barditch-Crovo PA, Kornhauser DM, Farzadegan H, Nerhood LJ, Chaisson RE, Bell KM, Lorentsen KJ, Hendrix CW, Petty BG, et al. Pharmacokinetics, toxicity, and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2544-50.

Forsbach A, Muller C, Montino C, Kritzler A, Curdt R, Benahmed A, Jurk M, Vollmer J. Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference. *Immunol Lett* 2012; 141: 169-80.

Francis DP, Essex M, Hardy WD, Jr. Excretion of feline leukaemia virus by naturally infected pet cats. *Nature* 1977; 269: 252-4.

Fukuma A, Yoshikawa R, Miyazawa T, Yasuda J. A new approach to establish a cell line with reduced risk of endogenous retroviruses. *PLoS One* 2013; 8: e61530.

Gao WY, Stein CA, Cohen JS, Dutschmann GE, Cheng YC. Effect of phosphorothioate homo-oligodeoxynucleotides on herpes simplex virus type 2-induced DNA polymerase. *J Biol Chem* 1989; 264: 11521-6.

Garcia JS, Jain N, Godley LA. An update on the safety and efficacy of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Onco Targets Ther* 2010; 3: 1-13.

Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2718-23.

Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus

production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8676-81.

Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P, Ray B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* 2009; 19: 2-15.

Giannecchini S, Di Fenza A, D'Ursi AM, Matteucci D, Rovero P, Bendinelli M. Antiviral activity and conformational features of an octapeptide derived from the membrane-proximal ectodomain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *J Virol* 2003; 77: 3724-33.

Ginsberg HS, Goebel WF, Horsfall FL, Jr. Inhibition of mumps virus multiplication by a polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* 1947; 66: 99.

Greggs WM, 3rd, Clouser CL, Patterson SE, Mansky LM. Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia virus. *J Gen Virol* 2012; 93: 900-5.

Grunweller A, Gillen C, Erdmann VA, Kurreck J. Cellular uptake and localization of a Cy3-labeled siRNA specific for the serine/threonine kinase Pim-1. *Oligonucleotides* 2003; 13: 345-52.

Gu W, Cochrane M, Leggatt GR, Payne E, Choyce A, Zhou F, Tindle R, McMillan NA. Both treated and untreated tumors are eliminated by short hairpin RNA-based induction of target-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8314-9.

Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348: 255-6.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E,

Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008; 118: 3132-42.

Haley B, Zamore PD. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 599-606.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6.

Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-8.

Hardy WD, Jr., Hess PW, MacEwen EG, McClelland AJ, Zuckerman EE, Essex M, Cotter SM, Jarrett O. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res* 1976; 36: 582-8.

Harper SQ, Staber PD, Beck CR, Fineberg SK, Stein C, Ochoa D, Davidson BL. Optimization of feline immunodeficiency virus vectors for RNA interference. *J Virol* 2006; 80: 9371-80.

Hartmann K, Hein J. *Infektionskrankheiten der Katze*. 1st edn. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG. 2008: 21

Hartmann K, Donath A, Beer B, Egberink HF, Horzinek MC, Lutz H, Hoffmann-Fezer G, Thum I, Thefeld S. Use of two virustatica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 35: 167-75.

Hartmann K. Antiviral and Immunomodulatory Chemotherapy. In: Infectious Diseases of the dog and cat, 4th edn. Greene CE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders 2012: 10-24.

Haschek WM, Weigel RM, Scherba G, DeVera MC, Feinmehl R, Solter P, Tompkins MB, Tompkins WA. Zidovudine toxicity to cats infected with feline leukemia virus. *Fundam Appl Toxicol* 1990; 14: 764-75.

Hatta T, Kim SG, Nakashima H, Yamamoto N, Sakamoto K, Yokoyama S, Takaku H. Mechanisms of the inhibition of reverse transcription by unmodified and modified antisense oligonucleotides. *FEBS Lett* 1993; 330: 161-4.

Hayashi S, Fine RL, Chou TC, Currens MJ, Broder S, Mitsuya H. *In vitro* inhibition of the infectivity and replication of human immunodeficiency virus type 1 by combination of antiretroviral 2',3'-dideoxynucleosides and virus-binding inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 82-8.

He C, Yin L, Tang C, Yin C. Multifunctional polymeric nanoparticles for oral delivery of TNF- α siRNA to macrophages. *Biomaterials* 2013; 34: 2843-54.

He Y, Cao W, Pan S, Zhong F, Zhang M. Inhibition of canine parvovirus replication in cultured cells by small interfering RNAs expressed from plasmid vectors. *Antiviral Res* 2012; 95: 237-41.

Helgstrand E, Eriksson B, Johansson NG, Lannero B, Larsson A, Misiorny A, Noren JO, Sjoberg B, Stenberg K, Stening G, Stridh S, Oberg B. Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* 1978; 201: 819-21.

Henschel A, Buchholz F, Habermann B. DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: W113-20.

Hooper LV, Manzella SM, Baenziger JU. From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J* 1996; 10: 1137-46.

Hoover EA, Zeidner NS, Mullins JI. Therapy of presymptomatic FeLV-induced immunodeficiency syndrome with AZT in combination with alpha interferon. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 616: 258-69.

Hoover EA, Ebner JP, Zeidner NS, Mullins JI. Early therapy of feline leukemia virus infection (FeLV-FAIDS) with 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA). *Antiviral Res* 1991; 16: 77-92.

Hoover EA, Mullins JI. Feline leukemia virus infection and diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1287-97.

Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11: 263-70.

Horwitz JP, Chua J, Noel M. The monomesylates of 1 -(2'-deoxy-beta-D-lyxofuranosyl)thymine. *The Journal of Organic Chemistry* 1964; 29: 2076-8.

Horwitz JP, Chua J, DaRooge MA, Noel M, Klundt IL. Nucleosides. IX. The formation of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides in a novel β -elimination reaction. *The Journal of Organic Chemistry* 1966; 31 (1): 205-11.

Hughes JA, Rao GA. Targeted polymers for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 145-57.

Ito M, Baba M, Sato A, Pauwels R, De Clercq E, Shigeta S. Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. *Antiviral Res* 1987; 7: 361-7.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 635-7.

Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 2006a; 12: 1179-87.

Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 2006b; 12: 1197-205.

Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-8.

Jarrett O, Laird HM, Hay D, Crichton GW. Replication of cat leukemia virus in cell cultures. *Nature* 1968; 219: 521-2.

Jarrett O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet Microbiol* 1999; 69: 99-107.

Jarrett WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A Virus-Like Particle Associated With Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 1964; 202: 567-9.

Ji J, Wernli M, Klimkait T, Erb P. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett* 2003; 552: 247-52.

Jiang S, Lin K, Strick N, Neurath AR. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* 1993; 365: 113.

Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 457-62.

Kajiwarra K, Miyamoto T. Progress in Structural Activation of Functional Polysaccharides. In: *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*

2edn. Dumitriu S, ed. 270 Madison Avenue, New York, USA: Marcel Dekker 2005: 1-3.

Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2014-8.

Ketting RF. The many faces of RNAi. *Dev Cell* 2011; 20: 148-61.

Ketzinel-Gilad M, Shaul Y, Galun E. RNA interference for antiviral therapy. *J Gene Med* 2006; 8: 933-50.

Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 222-6.

Kim SS, Peer D, Kumar P, Subramanya S, Wu H, Asthana D, Habiro K, Yang YG, Manjunath N, Shimaoka M, Shankar P. RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. *Mol Ther* 2010; 18: 370-6.

Kim Y, Tewari M, Pajerowski JD, Cai S, Sen S, Williams JH, Sirsi SR, Lutz GJ, Discher DE. Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *J Control Release* 2009; 134: 132-40.

Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004; 78: 3436-46.

Kumar DV, Berry BT, Roy-Burman P. Nucleotide sequence and distinctive characteristics of the env gene of endogenous feline leukemia provirus. *J Virol* 1989; 63: 2379-84.

Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1628-44.

Kutter C, Svoboda P. miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol* 2008; 5: 181-8.

Kvaratskhelia M, Sharma A, Larue RC, Serrao E, Engelman A. Molecular mechanisms of retroviral integration site selection. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 10209-25.

Lederman S, Gulick R, Chess L. Dextran sulfate and heparin interact with CD4 molecules to inhibit the binding of coat protein (gp120) of HIV. *J Immunol* 1989; 143: 1149-54.

Lee MT, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol* 2003; 77: 11964-72.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21: 4663-70.

Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004; 117: 69-81.

Li X, Zhao Q, Qiu L. Smart ligand: aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. *J Control Release* 2013; 171: 152-62.

Lin TS, Prusoff WH. Synthesis and biological activity of several amino analogues of thymidine. *J Med Chem* 1978; 21: 109-12.

Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, Shen Y. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 4527-35.

Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 2003; 301: 1921-5.

Lombardi S, Massi C, Indino E, La Rosa C, Mazzetti P, Falcone ML, Rovero P, Fissi A, Pieroni O, Bandecchi P, Esposito F, Tozzini F, Bendinelli M, Garzelli C. Inhibition of feline immunodeficiency virus infection *in vitro* by envelope glycoprotein synthetic peptides. *Virology* 1996; 220: 274-84.

Loretsen KJ, Hendrix CW, Collins JM, Kornhauser DM, Petty BG, Klecker RW, Flexner C, Eckel RH, Lietman PS. Dextran sulfate is poorly absorbed after oral administration. *Ann Intern Med* 1989; 111: 561-6.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8.

Luten J, van Nostrum CF, De Smedt SC, Hennink WE. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J Control Release* 2008; 126: 97-110.

Ma Y, Chan CY, He ML. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5169-79.

Marimani MD, Ely A, Buff MC, Bernhardt S, Engels JW, Arbuthnot P. Inhibition of hepatitis B virus replication in cultured cells and *in vivo* using 2'-O-guanidinopropyl modified siRNAs. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 6145-55.

Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 2004; 18: 975-80.

Martinez MA, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Blanco J, Parera M, Gomez J, Clotet B, Este JA. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 2002; 16: 2385-90.

Mathes LE, Hayes KA, Swenson CL, Polas PJ, Weisbrode SE, Kociba GJ. Evaluation of antiviral activity and toxicity of dextran sulfate in feline leukemia virus-infected cats. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2147-50.

Mathes LE, Polas PJ, Hayes KA, Swenson CL, Johnson S, Kociba GJ. Pre- and postexposure chemoprophylaxis: evidence that 3'-azido-3'-dideoxythymidine inhibits feline leukemia virus disease by a drug-induced vaccine response. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2715-21.

Matzke MA, Matzke AJ, Pruss GJ, Vance VB. RNA-based silencing strategies in plants. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 221-7.

McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; 418: 38-9.

McDonagh P, Sheehy PA, Norris JM. *In vitro* inhibition of feline coronavirus replication by small interfering RNAs. *Vet Microbiol* 2011; 150: 220-9.

Mendoza R, Anderson MM, Overbaugh J. A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J Virol* 2006; 80: 3378-85.

Mishra N, Rajukumar K, Kalaiyarasu S, Behera SP, Nema RK, Dubey SC. Small interfering RNAs targeting viral structural envelope protein genes and the 5-UTR inhibit replication of bovine viral diarrhea virus in MDBK cells. *Acta Virol* 2011; 55: 279-82.

Mitsuya H, Broder S. Inhibition of the *in vitro* infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 1911-

5.

Mitsuya H, Looney DJ, Kuno S, Ueno R, Wong-Staal F, Broder S. Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells. *Science* 1988; 240: 646-9.

Mohanan D, Slutter B, Henriksen-Lacey M, Jiskoot W, Bouwstra JA, Perrie Y, Kundig TM, Gander B, Johansen P. Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. *J Control Release* 2010; 147: 342-9.

Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 2010; 629: 141-58.

Moreira JN, Santos A, Moura V, Pedroso de Lima MC, Simoes S. Non-viral lipid-based nanoparticles for targeted cancer systemic gene silencing. *J Nanosci Nanotechnol* 2008; 8: 2187-204.

Motavaf M, Safari S, Alavian SM. Therapeutic potential of RNA interference: a new molecular approach to antiviral treatment for hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012; 19: 757-65.

Moysan E, Bastiat G, Benoit JP. Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: a review of several promising chemical modifications. *Mol Pharm* 2013; 10: 430-44.

Mukherji E, Au JL, Mathes LE. Differential antiviral activities and intracellular metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in human cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1573-9.

Nabzdyk CS, Chun M, Pradhan L, Logerfo FW. High throughput RNAi assay optimization using adherent cell cytometry. *J Transl Med* 2011; 9: 48.

Naito Y, Ui-Tei K. Designing functional siRNA with reduced off-target effects. *Methods Mol Biol* 2013; 942: 57-68.

Nakashima H, Yoshida O, Tochikura TS, Yoshida T, Mimura T, Kido Y, Motoki Y, Kaneko Y, Uryu T, Yamamoto N. Sulfation of polysaccharides generates potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus infection and replication *in vitro*. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78: 1164-8.

Nakata R, Miyazawa T, Shin YS, Watanabe R, Mikami T, Matsuura Y. Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. *Microbes Infect* 2003; 5: 947-50.

Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002; 8: 681-6.

O' Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. Figure 2. Mechanism of RNAi induced gene silencing. 2015; 15.03.2015: <http://aws.labome.com/figure/te-197-2.png>.

Okada M, Yoshikawa R, Shojima T, Baba K, Miyazawa T. Susceptibility and production of a feline endogenous retrovirus (RD-114 virus) in various feline cell lines. *Virus Res* 2011; 155: 268-73.

Operario DJ, Reynolds HM, Kim B. Comparison of DNA polymerase activities between recombinant feline immunodeficiency and leukemia virus reverse transcriptases. *Virology* 2005; 335: 106-21.

Ornelas SS, Barra GB, Kanzaki LIB. Inhibition of Feline Leukemia Virus Replication in Chronically Infected Cell Line Utilizing RNA Interference. *Libertas Academica* 2012; 4: 13-20.

Parish CR, Low L, Warren HS, Cunningham AL. A polyanion binding site on the

CD4 molecule. Proximity to the HIV-gp120 binding region. J Immunol 1990; 145: 1188-95.

Park WS, Miyano-Kurosaki N, Hayafune M, Nakajima E, Matsuzaki T, Shimada F, Takaku H. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. Nucleic Acids Res 2002; 30: 4830-5.

Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. Nat Rev Cancer 2011; 11: 59-67.

Pedersen NC. Feline retrovirus infections. Dev Biol Stand 1990; 72: 149-55.

Perry CM, Balfour JA. Didanosine. An update on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease. Drugs 1996; 52: 928-62.

Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). RNA 2004; 10: 12-8.

Pertusati F, Hinsinger K, Flynn AS, Powell N, Tristram A, Balzarini J, McGuigan C. PMPA and PMEA prodrugs for the treatment of HIV infections and human papillomavirus (HPV) associated neoplasia and cancer. Eur J Med Chem 2014; 78: 259-68.

Piret J, Lamontagne J, Bestman-Smith J, Roy S, Gourde P, Desormeaux A, Omar RF, Juhasz J, Bergeron MG. *In vitro* and *in vivo* evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses. J Clin Microbiol 2000; 38: 110-9.

Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs

among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J 1989; 8: 3867-74.

Polas PJ, Swenson CL, Sams R, Cheney CM, Hayes KA, Tarr MJ, Kociba GJ, Mathes LE. *In vitro* and *in vivo* evidence that the antiviral activity of 2',3'-dideoxycytidine is target cell dependent in a feline retrovirus animal model. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 1414-21.

Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 183-8.

Rajput R, Khanna M, Kumar P, Kumar B, Sharma S, Gupta N, Saxena L. Small interfering RNA targeting the nonstructural gene 1 transcript inhibits influenza A virus replication in experimental mice. Nucleic Acid Ther 2012; 22: 414-22.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61: 746-59.

Ravichandran S. An overview on HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2008; 3: 171-87.

Remington KM, Chesebro B, Wehrly K, Pedersen NC, North TW. Mutants of feline immunodeficiency virus resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine. J Virol 1991; 65: 308-12.

Ren GL, Huang GY, Zheng H, Fang Y, Ma HH, Xu MC, Zhang HB, Zhang WY, Zhao YG, Sun DY, Hu WK, Liu J. Changes in innate and permissive immune responses after HBV transgenic mouse vaccination and long-term-siRNA treatment. PLoS One 2013; 8: e57525.

Reno JM, Lee LF, Boezi JA. Inhibition of herpesvirus replication and herpesvirus-induced deoxyribonucleic acid polymerase by phosphonoformate. Antimicrob

Agents Chemother 1978; 13: 188-92.

Rezende LF, Drosopoulos WC, Prasad VR. The influence of 3TC resistance mutation M184I on the fidelity and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. Nucleic Acids Res 1998; 26: 3066-72.

Robert-Tissot C, Ruegger VL, Cattori V, Meli ML, Riond B, Gomes-Keller MA, Vogtlin A, Wittig B, Juhls C, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. The innate antiviral immune system of the cat: molecular tools for the measurement of its state of activation. Vet Immunol Immunopathol 2011; 143: 269-81.

Rosenberg ZF, Pedersen FS, Haseltine WA. Comparative analysis of the genomes of feline leukemia viruses. J Virol 1980; 35: 542-6.

Savarino A, Pistello M, D'Ostilio D, Zabogli E, Taglia F, Mancini F, Ferro S, Matteucci D, De Luca L, Barreca ML, Ciervo A, Chimirri A, Ciccozzi M, Bendinelli M. Human immunodeficiency virus integrase inhibitors efficiently suppress feline immunodeficiency virus replication *in vitro* and provide a rationale to redesign antiretroviral treatment for feline AIDS. Retrovirology 2007; 4: 79.

Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Haas S, Wissler M, Muessig A, Tisdale JF, Kuramoto K, Andrews RG, Wu T, Kiem HP, Dunbar CE, von Kalle C. Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. Blood 2002; 100: 2737-43.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 2003; 115: 199-208.

Schyth BD, Lorenzen N, Pedersen FS. Antiviral activity of small interfering RNAs: specificity testing using heterologous virus reveals interferon-related effects overlooked by conventional mismatch controls. Virology 2006; 349: 134-41.

Schyth BD, Lorenzen N, Pedersen FS. A high throughput *in vivo* model for testing delivery and antiviral effects of siRNAs in vertebrates. *Mol Ther* 2007; 15: 1366-72.

Semizarov D, Kroeger P, Fesik S. siRNA-mediated gene silencing: a global genome view. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3836-45.

Sharma S, Rao A. RNAi screening: tips and techniques. *Nat Immunol* 2009; 10: 799-804.

Shaunak S, Thornton M, John S, Teo I, Peers E, Mason P, Krausz T, Davies DS. Reduction of the viral load of HIV-1 after the intraperitoneal administration of dextrin 2-sulphate in patients with AIDS. *AIDS* 1998; 12: 399-409.

Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 2005; 348: 1079-90.

Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 127-38.

Stewart H, Adema KW, McMonagle EL, Hosie MJ, Willett BJ. Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. *Retrovirology* 2012; 9: 48.

Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JI, Onions DE, Neil JC. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J Virol* 1986; 58: 825-34.

Sundquist B, Oberg B. Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. *J Gen Virol* 1979; 45: 273-81.

Swenson CL, Sams RA, Polas PJ, Michael DF, Mathes LE. Age-related differences in pharmacokinetics of phosphonoformate in cats. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 871-4.

Swenson CL, Polas PJ, Cheney CM, Kociba GJ, Mathes LE. Prophylactic and therapeutic effects of phosphonoformate against feline leukemia virus *in vitro*. *Am J Vet Res* 1991; 52: 2010-5.

Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 2002; 109: 861-71.

Tandon R, Cattori V, Gomes-Keller MA, Meli ML, Golder MC, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2005; 130: 124-32.

Tavares L, Roneker C, Johnston K, Lehrman SN, de Noronha F. 3'-Azido-3'-deoxythymidine in feline leukemia virus-infected cats: a model for therapy and prophylaxis of AIDS. *Cancer Res* 1987; 47: 3190-4.

Tavares L, Roneker C, Postie L, de Noronha F. Testing of nucleoside analogues in cats infected with feline leukemia virus: a model. *Intervirology* 1989; 30 Suppl 1: 26-35.

ter Brake O, Legrand N, von Eije KJ, Centlivre M, Spits H, Weijer K, Blom B, Berkhout B. Evaluation of safety and efficacy of RNAi against HIV-1 in the human immune system (Rag-2(-/-)gammac(-/-)) mouse model. *Gene Ther* 2009; 16: 148-53.

Tochikura TS, Nakashima H, Tanabe A, Yamamoto N. Human immunodeficiency virus (HIV)-induced cell fusion: quantification and its application for the simple and rapid screening of anti-HIV substances *in vitro*. *Virology* 1988; 164: 542-6.

Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8682-6.

Ueno R, Kuno S. Dextran sulphate, a potent anti-HIV agent *in vitro* having synergism with zidovudine. Lancet 1987; 1: 1379.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev 2006; 20: 515-24.

Vance V, Vaucheret H. RNA silencing in plants--defense and counterdefense. Science 2001; 292: 2277-80.

Vorhies JS, Nemunaitis J. Nonviral delivery vehicles for use in short hairpin RNA-based cancer therapies. Expert Rev Anticancer Ther 2007; 7: 373-82.

Wang Y, Smith KP. Safety of alternative antiviral agents for neonatal herpes simplex virus encephalitis and disseminated infection. J Pediatr Pharmacol Ther 2014; 19: 72-82.

Wasmuth S, Bauer D, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Topical antisense-oligonucleotides targeting IFN-gamma mRNA improve incidence and severity of herpetic stromal keratitis by cytokine specific and sequence unspecific effects. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008; 246: 443-51.

Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat Rev Drug Discov 2009; 8: 129-38.

Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. AIDS Res Hum Retroviruses 1993; 9: 1051-3.

Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ. Peptides

corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9770-4.

Wilkes RP, Kania SA. Use of interfering RNAs targeted against feline herpesvirus 1 glycoprotein D for inhibition of feline herpesvirus 1 infection of feline kidney cells. *Am J Vet Res* 2009; 70: 1018-25.

Wilson DS, Dalmaso G, Wang L, Sitaraman SV, Merlin D, Murthy N. Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF-alpha-siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. *Nat Mater* 2010; 9: 923-8.

Wilson JA, Richardson CD. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* 2005; 79: 7050-8.

Witvrouw M, De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 497-511.

Wu CJ, Huang HW, Liu CY, Hong CF, Chan YL. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res* 2005; 65: 45-8.

Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1515-9.

Wu K, Mu Y, Hu J, Lu L, Zhang X, Yang Y, Li Y, Liu F, Song D, Zhu Y, Wu J. Simultaneously inhibition of HIV and HBV replication through a dual small interfering RNA expression system. *Antiviral Res* 2007; 74: 142-9.

Xia Q, Radzio J, Anderson KS, Sluis-Cremer N. Probing nonnucleoside inhibitor-induced active-site distortion in HIV-1 reverse transcriptase by transient kinetic

analyses. *Protein Sci* 2007; 16: 1728-37.

Ye D, Zhang HF, Zhu LY, Wang LW, Chen LX. CIC-3 siRNA inhibits regulatory volume decrease in nasopharyngeal carcinoma cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2011; 31: 216-20.

Ye K, Jin S. Potent and specific inhibition of retrovirus production by coexpression of multiple siRNAs directed against different regions of viral genomes. *Biotechnol Prog* 2006; 22: 45-52.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6.

Young FE. The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep* 1988; 103: 242-5.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101: 25-33.

Zeidner NS, Strobel JD, Perigo NA, Hill DL, Mullins JI, Hoover EA. Treatment of FeLV-induced immunodeficiency syndrome (FeLV-FAIDS) with controlled release capsular implantation of 2',3'-dideoxycytidine. *Antiviral Res* 1989; 11: 147-60.

Zeidner NS, Rose LM, Mathiason-DuBard CK, Myles MH, Hill DL, Mullins JI, Hoover EA. Zidovudine in combination with alpha interferon and interleukin-2 as prophylactic therapy for FeLV-induced immunodeficiency syndrome (FeLV-FAIDS). *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3: 787-96.

Zeidner NS, Mathiason-DuBard CK, Hoover EA. Reversal of feline leukemia virus infection by adoptive transfer of lectin/interleukin-2-activated lymphocytes, interferon-alpha, and zidovudine. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993;

14: 22-32.

Zeidner NS, Mathiason-DuBard CK, Hoover EA. Reversal of feline leukemia virus infection by adoptive transfer of activated T lymphocytes, interferon alpha, and zidovudine. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1995; 10: 256-66.

Zeinalipour-Loizidou E, Nicolaou C, Nicolaides A, Kostrikis LG. HIV-1 integrase: from biology to chemotherapeutics. *Curr HIV Res* 2007; 5: 365-88.

Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002; 21: 5875-85.

Zhang J, Zheng J, Lu C, Du Q, Liang Z, Xi Z. Modification of the siRNA passenger strand by 5-nitroindole dramatically reduces its off-target effects. *Chembiochem* 2012; 13: 1940-5.

Zhang S, Zhao B, Jiang H, Wang B, Ma B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release* 2007; 123: 1-10.

Zhang W, Wang CY, Yang ST, Qin C, Hu JL, Xia XZ. Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 421-6.

Zhao GQ, Du ZD, Liang T, Liu JW, Zhang LN, Zhang ZH. RNA interference inhibits expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in rabbit corneal stromal cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2008; 44: 831-8.

VIII. DANKSAGUNG

Mein größter Dank geht an meine Doktormutter, Frau *Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann*, die mir nicht nur diese interessante Studie, sondern auch eine unvergesslich schöne und lehrreiche Zeit in der Medizinischen Kleintierklinik ermöglicht hat. Vielen herzlichen Dank für Deine Unterstützung und für Dein Vertrauen!

Mein nächster großer Dank geht an Frau *Dr. Karin Weber*, ohne die die technische Durchführung dieser Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für Deine stetige Hilfe und Geduld!

Vielen herzlichen Dank, Herr *Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter*, für Ihre besondere Hilfe und Mühe!

Liebe *Nicky*, vielen Dank auch für Deine Unterstützung!

Liebe *Kolleginnen und Kollegen* der Medizinischen Kleintierklinik, vielen Dank für die schöne Zeit mit Euch in der Klinik!

Mein geliebter Ehemann, *Alexander*, tausend Dank für Deine Liebe, Deinen Halt, Deinen Zuspruch und Deine stärkende Schulter. Danke, dass ich mich immer auf Dich verlassen kann, egal was passiert!

Meine geliebten *Eltern*, vielen Dank für alles! Danke, dass Ihr meinen zweiten beruflichen Weg unterstützt und an mich geglaubt habt. Ich bin sehr stolz, Euch als Eltern zu haben!

Meine lieben *Freunde*, herzlichen Dank für Eure Freundschaft und Unterstützung, nicht nur während der Dissertationszeit! Danke für Eure offenen Ohren, Vertrauen und Halt. Liebe *Julia*, vielen herzlichen Dank für Deine besondere Unterstützung und Deinen stetigen Rat. Vielen lieben Dank, liebe *Carola, Christina, Janine, Julia, Katharina* und *Teresa*, für die schöne Zeit mit Euch in der Klinik!